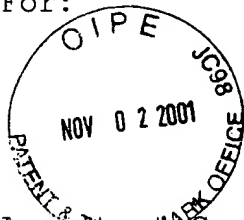


#40500  
PATENT  
1752-0151P

04CO  
11-07-01  
IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Akio INOUE et al. Conf.:  
Appl. No.: 09/983,067 Group: Unassigned  
Filed: October 23, 2001 Examiner: UNASSIGNED  
For: PROCESS FOR PRODUCING PEPTIDES BY USING IN  
VITRO TRANSCRIPTION/TRANSLATION SYSTEM



LETTER

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, DC 20231

November 2, 2001

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119 and 37 C.F.R. § 1.55(a), the applicants hereby claim the right of priority based on the following applications:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
Japan	2000-401417	December 28, 2000
Japan	2001-006910	January 15, 2001
Japan	2001-227094	July 27, 2001
Japan	2001-294795	September 26, 2001

A certified copy of the above-noted applications are attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to Deposit Account No. 02-2448 for any additional fee required under 37 C.F.R. §§ 1.16 or 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By Gerald M. Murphy, Jr.  
Gerald M. Murphy, Jr., #28,977

GMM/bsh  
1752-0151P  
Attachment

P.O. Box 747  
Falls Church, VA 22040-0747  
(703) 205-8000

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

AKIO INAGUE et al  
09/983,067  
filed Oct. 23, 2001  
1752-0151P  
BIRCH, STEWART, KOLASCH  
BIRCH, LLP  
(703) 205-8000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年12月28日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-401417

出 願 人  
Applicant(s):

株式会社ポストゲノム研究所

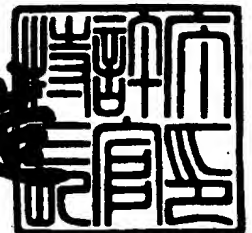


CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2001年10月19日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造



【書類名】 特許願

【整理番号】 SP0623KN

【提出日】 平成12年12月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 21/00

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県上尾市愛宕 2 - 1 6 - 1 3、サニーヒル B - 1 0  
1

【氏名】 井上 暁夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都渋谷区幡ヶ谷 3 - 3 1 - 1 0 - 4 0 7

【氏名】 清水 義宏

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1 - 1 7 0、東大宿舎 4 - 2  
0.4

【氏名】 上田 卓也

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都文京区西片 2 - 2 5 - 8、モンテベルデ本郷西片  
2 0 6 号

【氏名又は名称】 ベンチャーモール株式会社

【代表者】 村井 深

【代理人】

【識別番号】 100082739

【弁理士】

【氏名又は名称】 成瀬 勝夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100083080

【弁理士】

【氏名又は名称】 平田 克文

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011970

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 *in vitro*転写／翻訳系によるペプチド等の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 *in vitro*で、DNAを転写し次いで翻訳する系又はRNAを翻訳する系において、反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部が相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされており、他方の物質が吸着体として合成反応終了後に該ラベルされた蛋白質成分を捕捉するために使用されることを特徴とする *in vitro*転写／翻訳系によるペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項 2】 反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部をラベルする物質とラベルされた蛋白質成分を捕捉するための吸着体として用いられる物質との組合せが、一つの反応系において、複数組用いられることを特徴とする請求項 1 記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項 3】 相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白質成分が、転写／翻訳のための因子及び酵素の一部又は全部であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項 4】 転写／翻訳のための因子・酵素が、開始因子、延長因子、終結因子、アミノアシル tRNA シンテターゼ、メチオニル tRNA トランスフォルミラーゼ及び RNA ポリメラーゼよりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 3 記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項 5】 相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白質成分が、転写／翻訳のための因子・酵素及びそれ等以外の酵素類であって反応系の構成に必要とされる酵素類であることを特徴とする請求項 1 乃至 2 記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項 6】 転写／翻訳のための因子・酵素以外の酵素類であって反応系の構成に必要とされる酵素類が、反応系においてエネルギーを再生するための酵素及び転写・翻訳で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項 5 記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項 7】 *in vitro*での DNA 転写・翻訳系又は RNA 翻訳系が、終結因子を

含まないことを特徴とする請求項1乃至6記載のペプチド誘導体の製造方法。

【請求項8】 相互に付着し合う関係にある物質が、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質の関係にある物質であることを特徴とする請求項1乃至7記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項9】 アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質の関係にある物質の組合せが、蛋白質又はペプチド断片と金属イオンとの結合、抗原と抗体との結合、蛋白質と蛋白質又はペプチド断片との結合、蛋白質と特定のアミノ酸、DNA、色素、ビタミン、レクチン等の低分子化合物との結合、蛋白質と糖との結合、蛋白質又はペプチド断片とイオン交換樹脂との結合をいう関係にある物質の組合せから選ばれることを特徴とする請求項8記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項10】 蛋白質又はペプチド断片と金属イオンとの結合をいう関係にある物質の組合せが、ヒスチジンタグとニッケル錯体又はコバルト錯体であることを特徴とする請求項9記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項11】 相互に付着し合う関係にある物質が、磁力により付着し合う関係にある物質であることを特徴とする請求項1乃至7記載のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【請求項12】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成する蛋白質成分の一部又は全部であって、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白質成分を含むことを特徴とする*in vitro*転写／翻訳系によりペプチド又はペプチド誘導体を製造するための酵素・因子キット。

【請求項13】 反応系を構成する蛋白質成分が、転写／翻訳のための因子・酵素及び／又はそれ等以外の酵素類であって反応系の構成に必要とされる酵素類であることを特徴とする請求項12記載の酵素・因子キット。

【請求項14】 転写／翻訳のための因子・酵素が、開始因子、延長因子、終結因子、アミノアシルtRNAシンテターゼ及びメチオニルtRNAトランスフォルミラーゼよりなる群から選ばれることを特徴とする請求項13記載の酵素・因子キット。

【請求項15】 転写／翻訳のための因子・酵素以外の酵素類であって反応系

の構成に必要とされる酵素類が、反応系においてエネルギーを再生するための酵素及び転写・翻訳で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素よりなる群から選ばれることを特徴とする請求項13記載の酵素・因子キット。

【請求項16】 相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白性成分を捕捉するための吸着体を含むことを特徴とする請求項12乃至15記載の酵素・因子キット。

【請求項17】 反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部をラベルする物質とラベルされた蛋白質成分を捕捉するための吸着体として用いられる物質との組合せにおいて、異なる組合せを含むことを特徴とする請求項12乃至16記載の酵素・因子キット。

【請求項18】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている開始因子。

【請求項19】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている延長因子。

【請求項20】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている終結因子。

【請求項21】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているアミノアシル tRNA シンテターゼ。

【請求項22】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているメチオニル tRNA トランスフォルミラーゼ。

【請求項23】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているRNAポリメラーゼ。

【請求項24】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているT7RNAポリメラーゼ。

【請求項25】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系を構成するための、ヒスチジンタグでラベルされているT7RNAポリメラーゼ。

【請求項26】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するため

の、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている反応系においてエネルギーを再生するための酵素。

【請求項27】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている転写・翻訳で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素。

【請求項28】 *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系によりペプチド又はペプチド誘導体を製造するに当たり、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている反応系を構成する蛋白質成分を捕捉するための吸着体。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、*in vitro*でのDNAからの転写・翻訳系又はRNAからの翻訳系によりペプチド又はペプチド誘導体を製造する方法及び該反応系を構成するための酵素・因子キットに関わる。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

大腸菌、ウサギの網状赤血球、或いはコムギ胚芽由来の無細胞蛋白合成系は既に知られている(Current Opinion in Biotechnology 9: 534-548 (1998) and J. Biotechnology 41: 81-90 (1995))。かかる無細胞系によるペプチドの合成は、数時間でペプチドを合成することが可能であり、宿主細胞に外来遺伝子を挿入して発現させる場合に比べ、短時間でタンパク質の合成が可能である(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997), FEBS Letters 414: 268-270 (1997))。その他にも無細胞系によるペプチドの合成は、少なくとも理論上は、宿主細胞に外来遺伝子を挿入して発現させる場合に比べ、数多くの技術的利点が認められ、或いは期待されるに至っている。即ち、宿主細胞由来のプロテアーゼによる分解を受け得るペプチドや宿主細胞に対して毒性を有するペプチドの製造、更には、非天然型アミノ酸残基でチャージされたアミノアシル tRNAを用いて特定の位置に非天然型アミノ酸残基を導入することによる、自然界には存在しないペプチド誘導体の製造 (Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 24: 435-462 (1995))、



或いは、mRNA、リボソーム及びペプチドよりなる複合体（ポリソームディスプレイ）の製造が可能である。なお、ポリソームディスプレイ及びその利用に関しては、Roberts RW. He M.. et al., J. Immunological Methods 231 (2000) pp. 105-117、Schaffitzel C., J. Immunological Methods 231 (2000) pp. 119-135及びCurrent Opinion in Chemical Biology 3 (1999) pp. 268-273、同9(1998) pp.534-548、就中、pp.543以下に解説がされている外、FEBS Lett. 450: 105-110 (1999)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14130-14135 (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937-4942 (1997)等に記載がされている。

#### 【 0 0 0 3 】

当初は、細胞の抽出物そのものを利用していたが、反応が不安定であり、ペプチドの合成収量が生細胞の0.1～0.01%と低かった。その後、次第に抽出物中に存在する遺伝子発現に必要な成分が明らかにされると共に、不要な成分や阻害物質、例えば、mRNAを分解する内因性のヌクレアーゼ(RNA 6: 1079-1090\_(2000))が含まれていることが明らかになり、それ等を除去する試みがなされるようになった。しかし、細胞抽出物をベースとし、そこから不要な成分を除くという従来の方法では、反応に必要なエネルギーが枯渇し、バッチシステムでのペプチド合成は約1時間で反応が停止してしまう。その原因として、ヌクレオチド三リン酸の欠乏 (Biochim. Biophys. Acta. 1293: 207-212 (1996) 、 J. Biotechnol. 48: 1-8 (1996))、内在性の酵素による三リン酸の加水分解物のような小さな副産物の蓄積によるもの (Biochemistry 22: 346-354 (1983) 、 J. Biol. Chem. 260: 15585-15591 (1985))、或いは、転写・翻訳に必要なでない因子によるエネルギーの消費 (J. Ferment. Bioeng. 84: 7-13 (1997) and J. Biotechnol. 61: 199-208 (1998))等が挙げられる。

#### 【 0 0 0 4 】

転写・翻訳型ペプチド合成系を用いて基質を連続的に供給する場合、短時間で反応が停止するという問題は回避できるが、その場合においても、再現性に欠けるという問題があった。この問題は、コムギ胚芽を用いた系について研究が行われ、胚芽リボソームを不活性化する物質 (trititin) 及び翻訳開始反応阻害物質の存在が突き止められ、これらを胚芽から除去する方法が講じられることで解決さ

れた (Bio Industry Vol.17, No.5, 20-27(2000))。しかし、依然として、翻訳に無関係なエネルギーの消費が非常に大きい。

#### 【0005】

かかる従来法における問題は、細胞抽出物中には、転写・翻訳に必要でない未知の諸成分が存在し、それ等を完全に除去することが困難であることに起因していると考えられた。そこで、翻訳に必須な酵素・因子だけを用いたインビトロでのペプチド合成の試みが1977年に行われた (The Journal of Biological Chemistry Vol.252, No.19, 6889-6894(1997))。ここでは、DNAから $\beta$ -ガラクトシダーゼを合成するために、大腸菌のリボソームに加えて、転写／翻訳のための因子・酵素として、大腸菌抽出物から精製された次の33の成分のみが用いられた：RNAポリメラーゼ、 $N^{10}$ -フォルミルテトラヒドロ葉酸Met-tRNA<sup>f</sup>トランスフォルミラーゼ、20アミノアシルtRNAシンテターゼ、IF-1、IF-2、IF-3、EF-Tu、EF-G、RF-1及び／又はRF-2、CRP、L及びL $\alpha$ 。しかし、当時は翻訳機構に関する情報が乏しかったこと、そしてペプチドの精製技術が未熟であったために目的物は微量しか得られなかった。

#### 【0006】

その後、Ganozaと彼の共同研究者はあらかじめチャージされた（活性化されたアミノ酸の結合した）アミノアシルtRNAと精製された翻訳因子を用いた *in vitro* ペプチド合成系を構築した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 126: 792-798 (1985))。一方、Pavlovと彼の共同研究者は部分精製されたアミノアシルtRNAシンテターゼ混合液と精製された翻訳因子を用いて *in vitro* の翻訳系を構築した (Archives of Biochemistry and Biophysics Vol.328, No.1, 9-16, (1996))。また、Pavlovらは人工的に合成した短いmRNAから *in vitro* で翻訳する系を全て精製された翻訳因子を用いて構築した (J. Mol. Biol. 273:389-401(1997))。しかしながら、本発明者等の知る限りでは、必須酵素と因子だけから成る *in vitro* ペプチド合成系で、自然界に存在するmRNAからタンパク質が合成されたという報告はない。更に、従来の細胞抽出物を用いる無細胞ペプチド合成系や *in vitro* ペプチド合成系では、生成した目的ペプチドを反応系内に存在する蛋白性成分から単離・精製するために煩雑な操作を必要とし、その故に、目的ペプチドの収率は低

いレベルにとどまっていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

in vitroのペプチド合成系において、エネルギー枯渇の問題を改善し、効率的な蛋白質合成系の構築を目指すと共に、生成したペプチドを反応系から効率よく、しかも高純度で単離することができるin vitroペプチド合成系の提供を目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明は、in vitroで、DNAを転写し次いで翻訳する系又はRNAを翻訳する系において、反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部が相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされており、他方の物質が吸着体として合成反応終了後に該ラベルされた蛋白質成分を捕捉するために使用されることを特徴とするin vitro転写／翻訳系によるペプチド又はペプチド誘導体の製造方法である。ここで、反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部をラベルする物質とラベルされた蛋白質成分を捕捉するための吸着体として用いられる物質との組合せが、一つの反応系において、複数組用いられていてもよい。

【0009】

そして、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白質成分が、転写／翻訳のための因子・酵素の一部又は全部であることことができ、具体例として、開始因子、延長因子、終結因子、アミノアシルtRNAシンテターゼ、メチオニルtRNAトランスフォルミラーゼ及びRNAポリメラーゼを挙げることができる。

【0010】

更に、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白質成分が、転写／翻訳のための因子・酵素及びそれ等以外の酵素類であって反応系の構成に必要とされる酵素類であってもよく、ここで、転写／翻訳のための因子・酵素以外の酵素類であって反応系の構成に必要とされる酵素類の具体例として、反応系においてエネルギーを再生するための酵素及び転写・翻訳で生じる無機ピロ

リン酸の分解のための酵素を挙げることができる。

【0011】

なお、本発明によれば、*in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系において、終結因子を含ませないことにより、所望の位置に非天然型アミノ酸残基が挿入された非天然型ペプチドやポリソームディスプレイといったペプチド誘導体を製造することができる。

【0012】

本発明において、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質の関係にある物質の組合せは、蛋白質又はペプチド断片と金属イオンとの結合、抗原と抗体との結合、蛋白質と蛋白質又はペプチド断片との結合、蛋白質と特定のアミノ酸、DNA、色素、ビタミン、レクチン等の低分子化合物との結合、蛋白質と糖との結合、蛋白質又はペプチド断片とイオン交換樹脂との結合をいう関係にある物質の組合せから選ぶことができ、中でも、蛋白質又はペプチド断片と金属イオンとの結合性を利用する、ヒスチジントグとニッケル錯体、コバルト錯体等の金属キレートとの組合せが好ましい例である。

【0013】

本発明において使用し得る、相互に付着し合う関係にある物質は、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質の関係にある物質に限られることなく、例えば、磁力により付着し合う関係にある物質であってもよい。

【0014】

更に、本発明は、*in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成する蛋白質成分の一部又は全部であって、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白質成分を含むことを特徴とする*in vitro*転写／翻訳系によりペプチド又はペプチド誘導体を製造するための酵素・因子キットである。

ここで、反応系を構成する蛋白質成分は、転写／翻訳のための因子・酵素及び／又はそれ等以外の酵素類であって反応系の構成に必要とされる酵素類であることができ、転写／翻訳のための因子・酵素の具体例として、開始因子、延長因子、終結因子、アミノアシルtRNAシンテターゼ及びメチオニルtRNAトランスフォルミラーゼを挙げることができ、転写／翻訳のための因子・酵素以外の酵素類であ

って反応系の構成に必要とされる酵素類の具体例として、反応系においてエネルギーを再生するための酵素及び転写・翻訳で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素を挙げることができる。そして、本発明の酵素・因子キットは、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている蛋白性成分を捕捉するための吸着体を含むことができる。

## 【 0 0 1 5 】

また、本発明の酵素・因子キットは、反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部をラベルする物質とラベルされた蛋白質成分を捕捉するための吸着体として用いられる物質との組合せにおいて、異なる組合せを含んでいてもよい。

## 【 0 0 1 6 】

本発明は、また、次の発明を含む：(1) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている開始因子。(2) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている延長因子。(3) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている終結因子。(4) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているアミノアシルtRNAシンテターゼ。(5) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているメチオニルtRNAトランスフォルミラーゼ。(6) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているRNAポリメラーゼ。(7) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされているT7RNAポリメラーゼ。(8) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系を構成するための、ヒスチジンタグでラベルされているT7RNAポリメラーゼ。(9) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている反応系においてエネルギーを再生するための酵素。(10) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系を構成するための、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている転写・翻訳で生じる無機ピロリ

ン酸の分解のための酵素。(11) *in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系によりペプチド又はペプチド誘導体を製造するに当たり、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされている反応系を構成する蛋白質成分を捕捉するための吸着体。

## 【 0 0 1 7 】

## 【発明の実施の形態】

本発明における*in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系とは、細胞そのものを使用することなく、DNAからの転写・翻訳、或いは、RNAの翻訳を行わせるペプチド合成のための反応系であり、人為的に再構成された反応系成分のみでRNAの翻訳、或いはDNAからの転写・翻訳を行わせるペプチド合成のための反応系を含む。本発明にいうペプチドとは、2個以上の天然型または非天然型アミノ酸がペプチド結合によって結合したものをいい、オリゴペプチド、ポリペプチドを含む。更に、ポリペプチドが特定の立体構造をとったタンパク質と呼ばれる状態にあるものも含む。本発明にいうRNAは合成されたRNA及びmRNAを含み、DNAは、合成されたDNA及びcDNAを含む。

## 【 0 0 1 8 】

本発明における*in vitro*でのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系は、原核細胞由来または真核細胞由来の反応系であり、リボソーム、転写／翻訳のための因子・酵素、それ等以外に反応系の構成に必要な酵素類、各種基質、緩衝液及び塩類から構成される。本発明は、完全に再構成された反応系において優れた効果を発揮するが、これら構成要素の幾つかが細胞抽出液由来の形で加えられた反応系であっても利用可能である。

## 【 0 0 1 9 】

転写／翻訳のための因子・酵素としては、大腸菌等の原核細胞由来のものに限らず、真核細胞由来のものも使用でき、(1) RNAの翻訳の場合は、開始因子、延長因子、終結因子、20アミノアシルtRNAシンテターゼ、天然型または非天然型アミノ酸と結合したtRNAであり、大腸菌由来の反応系である場合はメチオニルtRNAトランスフォルミラーゼを含む；(2) DNAからの転写／翻訳の場合は、(1)に加えてRNAポリメラーゼ、例えば、T7 RNAポリメラーゼを含む。なお

、上記（１）及び（２）から終結因子を除くことにより翻訳反応を制御することが可能である（後述）。

#### 【0020】

転写／翻訳のための因子・酵素以外の酵素類としては、エネルギーの再生のための酵素、例えば、クレアチンキナーゼ、ミヨキナーゼ又はヌクレオシドジフォスフェートキナーゼ（NDK）、転写・翻訳反応で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素、例えば、無機ピロフォスファターゼが挙げられる。

#### 【0021】

各種基質としては、天然型または非天然型アミノ酸、エネルギー源としてのヌクレオチド三リン酸、クレアチンフォスフェート及びフォルミル葉酸が挙げられる。ここで、ヌクレオチド三リン酸には、ATP、GTP、CTP、UTPが挙げられ、上記（１）の場合は、ATP及びGTPが用いられ、（２）の場合は、ATP、GTP、CTP及びUTPが用いられる。

#### 【0022】

緩衝液としては、リン酸カリウム緩衝液（pH 7.3）が通常使用され、塩類としては、グルタミン酸カリウム、塩化アンモニウム、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、プトレッシン（putrecine）、スperlミジン（spermidine）、ジチオトレイトール（DTT）等が通常使用される。なお、上記以外にも、適宜選択して使用できることはいうまでもない。

#### 【0023】

本発明の第1の特徴は、DNAからの転写・翻訳又はRNAからの翻訳により *in vitro* でペプチドを合成する系において、反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部が相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされており、且つ、合成反応終了後に、他方の物質を吸着体として用いて、該ラベルされた蛋白質成分を捕捉することである。かくして、目的生成物であるペプチドは、容易に反応系を構成する蛋白質成分から分離され、且つ、極めて高純度で得られる。

#### 【0024】

反応系を構成する蛋白質成分、中でも、転写／翻訳のための因子・酵素の個々については、その製造と精製のためにヒスチジンタグを利用することは行われた

例がある。例えば、延長因子の、EF-Tuの製造と精製 (Eur. J. Biochem. 210: 177-183 (1992))、EF-Gの製造と精製 (Cell 92: 131-139 (1998)) 及び EF-Ts の製造と精製 (Archives of Biochemistry and Biophysics 348: 157-162 (1997))、終結因子の RF2 の製造と精製 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8165-8169 (1998))、或いは、フェニルアラニル tRNA シンテターゼの製造と精製 (Protein Expression and Purification 8: 347-357 (1996)) 等においてヒスチジンタグが使用されている。しかし、これらは、無細胞蛋白合成系の構築が目的ではなく、それぞれのタンパクの機能や性質を調べることを目的として製造・精製がされたに過ぎない。

## 【 0 0 2 5 】

従来、遺伝子を大腸菌等で発現させる際に、ヒスチジンタグ／ニッケルカラム、グルタチオン S-トランスフェラーゼ／グルタチオン-セファロース樹脂カラム、エピトープタグ／抗体等のアフィニティークロマトグラフィーを利用する場合は、目的とするペプチドに吸着カラムに対し選択的結合能を有する残基を導入していた。また、市販されている、細胞抽出液を使用する無細胞系では、目的とするペプチドにヒスチジンタグを導入するベクターが用いられている。それ故、生成物はヒスチジンタグと目的ペプチドとの融合蛋白であり、合成後にペプチドからヒスチジンタグを酵素により切り離す必要がある。

## 【 0 0 2 6 】

本発明者等は、従来の方法とは逆に、目的とするペプチドではなく、*in vitro* ペプチド合成系を構成する蛋白質成分に、相互に付着し合う関係にある物質の一方を導入した。これは、転写／翻訳のための因子・酵素やそれ以外の酵素類を相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルしても転写／翻訳の反応が進行するという新たな発見に基づくものである。

## 【 0 0 2 7 】

本発明において使用し得る、相互に付着し合う関係にある物質の組合せは、転写／翻訳反応を阻害しないものであれば、何れであっても使用可能である。相互の付着は可逆的であっても、非可逆的であっても良いが、反応系を構成する蛋白質成分を繰り返し使用するためには、可逆的な付着を行う関係にある物質の組合



せを用いることが好ましい。

【0028】

相互に付着し合う関係にある物質の組合せの例として、吸着カラムと吸着カラムに対し選択的に結合し得る関係にある物質を挙げることができる。代表的な例として、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質の関係にある物質群が挙げられる。例えば、吸着カラムのリガンドがニッケルやコバルト等の金属錯体であり、吸着カラムに対し選択的に付着し得る物質がヒスチジンタグである。これ以外にも、後に詳述するように、反応を阻害しない限り、種々のリガンドとこれに選択的に吸着し得る物質をラベルとして使用することができる。即ち、本発明において、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質の関係にある物質の組合せは、蛋白質又はペプチド断片と金属イオンとの結合、抗原と抗体との結合、蛋白質と蛋白質又はペプチド断片との結合、蛋白質と特定のアミノ酸、DNA、色素、ビタミン、レクチン等の低分子化合物との結合、蛋白質と糖との結合、蛋白質又はペプチド断片とイオン交換樹脂との結合をいう関係にある物質の組合せから選ぶことができる。

【0029】

本発明において使用し得る、相互に付着し合う関係にある物質は、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質の関係にある物質に限られることなく、合目的的に選ぶことができ、例えば、磁力により付着し合う関係にある物質であってもよい。そのような例としては、磁気ビーズでラベルされた蛋白質とマグネットとの組合せを挙げることができる。即ち、ペプチド合成系を構成する蛋白質成分の夫々に磁気ビーズを結合させ、マグネットで吸着することにより捕捉することができる。

【0030】

本発明において、吸着体は、必要に応じ、カラム、マトリックス、フィルター、ビーズ等の形で、或いは、担体（支持体）に結合させて用いられる。担体への結合は、吸着体の性質に応じて、既知の手段から適宜選択して行うことができる。

【0031】

反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部をラベルする物質とラベルされた蛋白質成分を捕捉するための吸着体として用いられる物質との組合せが幾通りも存在するが、一つの反応系において、それ等の組合せが複数組用いられてもよい。寧ろ、蛋白質成分の種類に応じて最適のラベル物質を選び、それに対応する吸着体を選ぶことは好ましい態様であると言える。

## 【 0 0 3 2 】

反応系構成成分である転写／翻訳のための因子・酵素やその他の酵素類を、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルしたため、反応系を構成する各蛋白質成分が高純度の状態で得られ、未知の不要又は阻害成分が反応系内に持ち込まれることがなくなり、反応系の構成が確立できるようになった。その結果、反応効率が大幅に改善された。また、ペプチド合成反応終了後にこれら反応系構成成分から速やかに目的ペプチドを分離することが可能となった。従来の無細胞系では反応産物であるペプチドの方を抽出することによって精製を行ってきたため、精製方法は反応産物の物理的性質や化学的性質に応じて個々に工夫しなければならなかった。本発明は、反応系成分の方を吸着体により除去し、その結果として反応産物を精製することが出来るため、物理的・化学的性質にかかわらず理論上全ての反応産物に対して同一の精製方法が適用できる。しかも、得られる目的ペプチドの純度は極めて高い。

## 【 0 0 3 3 】

更に、本発明により、反応系成分のコントロールが確実に出来るようになった結果、終結因子を含まない系を確立することができる。このことは、種々のタイプのポリソームディスプレイを作ることを可能とし、*in vitro*ペプチド合成系の利用場面を拡大した。即ち、種々のDNA又はRNAを、終結因子を除いた本発明の*in vitro*ペプチド合成系において発現させ、ペプチド・RNA・リボソームの3者複合体（ポリソームディスプレイ）を得ることができる。これを、ペプチドをターゲットにして他の複合体から分離すれば、目的ペプチドとRNAとが同時に得られる。これに終結因子を作用させることにより対応するRNAが得られる。この場合も、相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルした終結因子を作用させれば、リボソームから切り離されたペプチド及びそれに対応するRNAを容易に単離

することができる。或いは、例えば、Curent Opinion in Biotechnology 9:534-548(1998)に記載されているように、単離されたポリソームディスプレイから、RT-PCR法を適用して対応するDNAを得ることができ、また、該ポリソームディスプレイをEDTAで分解させることによりRNAを得ることもできる。特に、ランダム発現において、選択された目的ペプチドに対応するRNA又はDNAの取得が容易となることは、技術的メリットが高い。ベーリンガーマンハイムバイオケミカル社製のウサギ網状赤血球キットを用いた、セミランダムDNA及びRNAの無細胞反応系における発現が知られているが、その操作は複雑である（特表平5-503000号公報）。

## 【0034】

反応系の構成成分を確実に制御できることは、*in vitro*ペプチド合成系による非天然型アミノ酸残基を有するペプチドの合成をも可能とした。即ち、本発明の製造方法において、非天然型アミノ酸残基でチャージされていると共にC末端の終止コドンとは異なった終止コドンに対応するサプレッサー tRNAを反応系に加え、且つ、非天然型アミノ酸残基の導入を所望する個所に該サプレッサー tRNAに対応する終止コドンを挿入することにより改変されたDNA又はRNAを転写／翻訳させることができる。より具体的に説明すれば、次の通りである。まず、非天然型アミノ酸残基を導入するために、オープンリーディングフレーム(ORF)内部の所望の位置に、終止コドン(UAA, UAG, UGA)のうち、例えば、UGA又はUAGを挿入し、翻訳の停止のためにはUAAを用いる。次いで、例えば、UGA及び／又はUAGに対応するアンチコドンを有するサプレッサー tRNAを*in vitro*転写で作成し、非天然アミノ酸をチャージさせる。このDNAとサプレッサー tRNAを用いて本発明の製造方法を実行して、転写・翻訳させれば部位特異的に非天然アミノ酸を挿入したペプチドを合成することができる。或いは、対応するRNAを別途合成して翻訳させることによっても合成することができる。

## 【0035】

上記反応系から終結因子を除いた反応系を用いれば、所望の個所に1又は複数個の非天然型アミノ酸残基を有するペプチド・mRNA・リボソームよりなるポリソームディスプレイを得ることができる。前述と同様に、これに、相互に付着し

合う関係にある物質の一方でラベルした終結因子を作用させれば、リボソームから切り離されたペプチド及びそれに対応するRNAを容易に単離することができる。或いは、例えば、*Curent Opinion in Biotechnology* 9:534-548(1998)に記載されているように、該ポリソームディスプレイから、RT-PCR法を適用して対応するDNAを得ることができ、また、該ポリソームディスプレイをEDTAで分解させることによりRNAを得ることもできる。

## 【0036】

かくして、本発明の製造方法により製造されるペプチド誘導体には、ポリソームディスプレイや所望の位置に非天然型アミノ酸残基を有する非天然型ペプチドが含まれる。

## 【0037】

本発明のペプチド又はペプチド誘導体の製造方法は、常法に従い、バッチ式で行うことができる外、連続的に基質等を供給し、或いは反応生成物を随時除去するフロー方式や透析法等、様々な方式で行うことができる（例えば、特公平7-110236号公報、蛋白質 核酸 酵素Vol.44, No.4, 598-605(1999)、*Current Opinion in Biotechnology* 9:534-548(1998) 参照）。

## 【0038】

以下に、例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。但し、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 【0039】

## (1) 本発明により製造することが出来るペプチド及びペプチド誘導体

本発明の製造方法によれば、あらゆるタイプの天然型ペプチドを製造することができ、宿主細胞内酵素で分解され得るもの、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）、リゾチーム（1 phage由来）、緑色蛍光蛋白質（GFP）等も製造することができる外、宿種細胞に対して毒性を示すものも製造することができる。ここに、天然型ペプチドとは、遺伝暗号で使われる20種の天然アミノ酸よりなるペプチドを言い、それ以外の $\alpha$ アミノ酸を含むペプチドを非天然型ペプチドと言うことにする。

## 【0040】

また、本発明の製造方法において、反応系に終結因子を含ませないことにより、ペプチド・RNA・リボソームの3者複合体（ポリソームディスプレイ）を容易に得ることができる。

#### 【0041】

更に、非天然型ペプチドを製造することも可能である。例えば、修飾された天然アミノ酸、修飾された非荷電アミノ酸、修飾された酸性アミノ酸、修飾された塩基性アミノ酸、非アルファ型アミノ酸、 $\Phi$ 、 $\Phi$ 角を変換したアミノ酸、或いは、ニトロ、アミジン、ヒドロキシルアミン、キノン、脂肪族化合物、環状及び不飽和炭化水素残基等から選ばれた官能基を含むアミノ酸等を有するペプチド等を挙げるることができる。これ等を、細胞抽出物を用いて無細胞蛋白合成系で合成する方法は既に知られている（例えば、特表平4-504651号公報参照）。非天然型ペプチドの具体例の一つとして、保護基の付いたシステインが適当な個所に挿入されたDHFR（自然界には存在しない）を挙げるることができる。更には、p-フルオロフェニルアラニン、p-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン等の非天然型アミノ酸残基を所望の位置に導入したペプチドを挙げるることができる。即ち、これ等3種の非天然型アミノ酸残基がb-ラクタマーゼの66番目のフェニルアラニン残基の部位に導入され、十分な酵素活性が見られたことは既に知られているが（Bio Industry 8: 749-759 (1991)）、かかる非天然型ペプチドも本発明の製造方法により容易に製造することができる。

#### 【0042】

##### (2) リボソーム

リボソームは、ペプチド合成の場であり、mRNAと結合し、アミノアシルtRNAをA部位に、ホルミルメチオニルtRNAまたはペプチジルtRNAをP部位に配位してペプチド結合形成反応を行う（Science 289: 920-930 (2000)）。本発明においては、かかる機能を有するものであれば、由来を問わず使用することが可能である。即ち、通常は、大腸菌由来のリボソームが使用されるが、真核細胞由来のものも使用できる。本発明において用いられるリボソームの好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌A19株、MRE600株から得られるものを挙げるることができる。

## 【0043】

(3) 本発明の *in vitro* ペプチド合成系で使用する転写／翻訳のための因子  
・ 酵素

## (3-1) 開始因子

開始因子は、ペプチド合成の過程において、翻訳開始複合体の形成に必須であるか、又は、これを著しく促進する因子であり、大腸菌由来のものとして、IF1、IF2及びIF3が知られている(Biochemistry 29: 5881-5889 (1990))。開始因子IF3は、翻訳の開始に必要な段階である、リボソームの30Sサブユニットと50Sサブユニットへの解離を促進し、また、翻訳開始複合体の形成の際に、フォルミルメチオニルtRNA以外のtRNAのP部位への挿入を阻害する。開始因子IF2は、フォルミルメチオニルtRNAと結合し、30SリボソームサブユニットのP部位へフォルミルメチオニルtRNAを運び、翻訳開始複合体を形成する。開始因子IF1は開始因子IF2、IF3の機能を促進する。本発明において用いられる開始因子の好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌K12株から得られるものを挙げることができるが、真核細胞由来のものも使用できる。

## 【0044】

## (3-2) 延長因子

延長因子EF-Tuは、GTP型とGDP型の2種類があり、GTP型はアミノアシルtRNAと結合してこれをリボソームのA部位へ運ぶ。EF-Tuがリボソームから離れる際にGTPが加水分解され、GDP型へ転換する。(EMBO J. 17: 7490-7497 (1998))。延長因子EF-Tsは、EF-Tu (GDP型) に結合し、GTP型への転換を促進する(Archives of Biochemistry and Biophysics 348: 157-162 (1997))。延長因子EF-Gは、ペプチド鎖伸長過程において、ペプチド結合形成反応の後の転位 (translocation) 反応を促進する(Nature Structural Biology 6: 643-647 (1999), FEMS Microbiology Reviews 23: 317-333 (1999))。本発明において用いられる延長因子の好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌K12株から得られるものを挙げることができるが、真核細胞由来のものも使用できる。

## 【0045】

## (3-3) 終結因子:

終結因子は蛋白質合成の終結、翻訳されたペプチド鎖の解離、さらに次のmRNAの翻訳開始へのリボソームの再生に必須である。これを含まない反応系でタンパク合成を行った場合は、終始コドンの手前で反応が止まり、リボソーム・ペプチド・mRNAの安定な3者複合体（ポリソームディスプレイ）の形成が容易に行える。またペプチド鎖への非天然アミノ酸を導入は、RF1, RF2のいずれかを反応系から省くことにより行われる。即ち、RF1を省いた場合はUAGコドン、RF2を省いた場合はUGAコドンへの非天然アミノ酸の導入が高い効率で行なわれる。

## 【 0 0 4 6 】

終結因子RF1及びRF2は、リボソームのA部位に停止コドン（UAA, UAG, UGA）が来た時、A部位に入ってペプチジルtRNA（P部位にある）からのペプチド鎖の解離を促進する。RF1は停止コドンのうちUAA, UAGを認識し、RF2はUAA, UGAを認識する。終結因子RF3は、RF1, RF2によるペプチド鎖の解離反応後の、RF1, RF2のリボソームからの解離を促進する。リボソーム再生因子（RRF）は、蛋白質合成の停止後、P部位に残っているtRNAの脱離と、次の蛋白質合成へのリボソームの再生を促進する。本発明においては、RRFも終結因子の一つとして取扱うことにする。なお、終結因子RF1, RF2, RF3及びRRFの機能については、EMBO J. 16: 4126-4133 (1997)、EMBO J. 16: 4134-4141 (1997)に解説されている。本発明において用いられる終結因子の好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌K12株から得られるものを挙げることができるが、真核細胞由来のものも使用できる。

## 【 0 0 4 7 】

## (3-4) アミノアシルtRNAシンテターゼ

アミノアシルtRNAシンテターゼは、ATPの存在下でアミノ酸とtRNAを共有結合させ、アミノアシルtRNAを合成する酵素である(RNA 3: 954-960 (1997), 蛋白質 核酸 酵素39: 1215-1225 (1994))。本発明において用いられるアミノアシルtRNAシンテターゼの好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌K12株から得られるものを挙げることができるが、真核細胞由来のものも使用できる。

## 【 0 0 4 8 】

## (3-5) メチオニル tRNA トランスフォルミラーゼ

原核生物におけるタンパク質合成系においては、メチオニンの端のアミノ基にフォルミル基がついたN-フォルミルメチオニン(fMet)が開始アミノ酸となる。このフォルミル基はメチオニル tRNA トランスフォルミラーゼ(MTF)によりメチオニル tRNA のメチオニンに付加される。即ち、メチオニル tRNA トランスフォルミラーゼは、N<sup>10</sup>-フォルミルテトラヒドロ葉酸のフォルミル基を、開始コドンに対応するメチオニル tRNA のN末端に転移し、フォルミルメチオニル tRNA にする(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 875-880 (1999))。付加されたフォルミル基は開始因子IF2により認識され、タンパク質合成の開始シグナルとして作用する。真核生物の細胞質における合成系にはMTFはないが、真核生物のミトコンドリア及び葉緑体における合成系には存在する。本発明において用いられるメチオニル tRNA トランスフォルミラーゼの好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌K12株から得られるものである。

【0049】

## (3-6) RNAポリメラーゼ

RNAポリメラーゼは、DNA配列をRNAに転写する酵素であり、様々な生物に存在することが知られている。その一例として、T7ファージ由来の、T7RNAポリメラーゼを挙げることができ、このポリメラーゼはT7プロモーターと呼ばれる特異的なDNA配列に結合してその下流のDNA配列をRNAに転写する酵素である。本発明者等は、T7RNAポリメラーゼのN末端にヒスタグを付加して、融合タンパク質として大腸菌BL21株において大量発現を行い、ニッケルカラムを用いるアフィニティクロマトグラフィーにより精製を行った。得られた、ヒスタグを有するT7RNAポリメラーゼは新規である。本発明においては、T7RNAポリメラーゼ以外にも種々のRNAポリメラーゼを用いることができる。例えば、T3やSP6 RNAポリメラーゼが市販されており、これ等を利用することができる。

【0050】

## (3-7) 非天然型アミノ酸と結合したアミノアシル tRNA

自然界に存在する蛋白質を構成する20種のアミノ酸以外の残基を蛋白質に導入することにより、本来の蛋白質が持つ機能を向上させたり、新たな有用な機能や



性質を付加することが出来る。非天然型アミノ酸と結合したアミノアシル tRNA は、サプレッサー tRNA の 3' 末端の CA が欠けたものを *in vitro* 転写により合成し、これに、有機化学的に合成された、非天然アミノ酸を結合したアミノアシル-pCpA を RNA ligase を用いて結合することにより製造される（バイオサイエンスとインダストリー 47: 16-24 (1989)）。

## 【0051】

(4) 本発明の *in vitro* ペプチド合成系で使用される、転写／翻訳のための因子・酵素以外の酵素類であって反応系の構成に必要とされる酵素類

(4-1) 反応系においてエネルギーを再生するための酵素

クレアチンキナーゼ、ミヨキナーゼ、ヌクレオシドジフォスフェートキナーゼ (NDK) 等が挙げられる。クレアチンキナーゼはクレアチンホスホキナーゼ (CPK) と呼ばれ、ATP からクレアチンへのリン酸基の転移反応を触媒する。ミヨキナーゼは、アデニル酸キナーゼとも呼ばれ、ADP から ATP を再生させると同時に AMP を生成させる。NDK は、ヌクレオシド二リン酸とヌクレオシド三リン酸の間の  $\gamma$ -リン酸転移を触媒する。本発明において用いられるこれ等酵素の好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌 K12 株から得られるものを挙げるができるが、真核細胞由来のものも使用できる。

## 【0052】

(4-2) 転写／翻訳で生じる無機ピロリン酸の分解のための酵素

無機ピロフォスファターゼを挙げることができ、本発明において用いられる好ましい例は、大腸菌由来のものであり、例えば大腸菌 K12 株から得られるものであるが、真核細胞由来のものも使用できる。

## 【0053】

以上、(3)～(4)に記載した、反応系の構成要素の内、蛋白質成分は、その N 末端または C 末端に、下記に詳述する相互に付着する関係にある物質の一方よりなる物質でラベルされた蛋白質、例えば、ヒスタグを結合させた融合蛋白質として、大腸菌、例えば、市販されている大腸菌 BL21 株を用いて大量発現させ、他方の物質を含む吸着体、例えば、FPLC に接続したニッケル固定化カラムを用いて精製し、反応系に供される。大腸菌以外にも、動物細胞、酵母、枯草菌等で発現

させることも可能であり、或いは、in vitroペプチド合成系で生産することも可能である。

【0054】

(5) 相互に付着し得る関係にある物質によるラベルと吸着体

本発明においては、上記(3)～(4)で説明した反応系を構成する蛋白質成分の全部または一部を相互に付着し得る関係にある物質の一方でラベルしておき、他方を吸着体として用いて該ラベルされた蛋白質成分を捕捉することにより、反応系で生成した目的ペプチドを単離する。かかる相互に付着し得る関係にある物質の代表的な例として、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質を挙げることができる。更に、本発明は、アフィニティークロマトグラフィーにおける相互作用物質に限らず、該蛋白質成分を捕捉するために使用できる相互に付着し得る関係にある物質であれば、何れの使用も含む。

【0055】

蛋白質は何らかの物質と特異的な相互作用をすることによって生理的な役割を果たしている。このような蛋白質と特定の物質(リガンド)との特異的な相互作用(親和性)を利用した吸着クロマトグラフィーをアフィニティークロマトグラフィーという。例えば、蛋白質又はペプチド断片と金属イオン乃至キレート化合物、抗原と抗体、サイトカインやホルモンと受容体、酵素と基質やインヒビターは互いに特異的に結合する。更に、特定のアミノ酸、DNA、色素、ビタミン、レクチン等はこれらに親和性を持つ一群のタンパク質と相互に結合する。

【0056】

これらの組合せの一方をリガンドとして担体又は支持体に固定して吸着体とし、そこに他方の物質でラベルされた物質(本発明においては、反応系を構成する蛋白質成分)を流すと、ラベル物質がリガンドに特異的に結合する。この特異的結合に基づくアフィニティークロマトグラフィーは、タンパク質の精製手段として常用されており、各種の担体が多くメーカーから販売されており、利用し易い技術手段である。例えば、抗原抗体反応を利用する蛋白質の精製手段として、構造が明らかな抗原決定基(エピトープ)と抗体(エピトープに特異的な抗体)の組合せが用いられており、種々の組合せを実施するために必要なベクターや吸着体

が市販されている。本発明の好ましい実施態様においては、かかるアフィニティークロマトグラフィーで用いられている相互に吸着する関係にある物質の組合せが利用される。本発明で利用されるラベルされた蛋白質成分を製造する際に、その精製のために当該ラベル物質が役立つ。しかし、蛋白質成分を同時に複数種のラベルを付しておき、製造時の精製のために役立てたラベルを切除し、残りのラベルを、*in vitro* 合成系で生成した目的蛋白質と分離するために役立てることも可能である。

## 【 0 0 5 7 】

以下に、相互に付着する関係にある物質の組合せの一部について、具体例を挙げながら本発明の実施態様を説明するが、もとよりこれらは例示であり、本発明がこれらに限定されるものではない。

## 【 0 0 5 8 】

(5-1) 蛋白質又はペプチド断片と金属イオン乃至キレート化合物との結合を利用する方法

## A. His tagとニッケル錯体、コバルト錯体等の金属錯体

His tagとニッケル錯体、コバルト錯体等の金属錯体との結合性を利用して蛋白質を精製することは通常行われている。即ち、発現させるDNAにHis tag配列を結合させておき、His tagを有する融合蛋白質を得、これをニッケル錯体、コバルト錯体、銅や亜鉛錯体のカラムで捕捉し精製する方法である。カラムからの溶出はイミダゾールを含む溶出剤により行うことができる(例えば、羊土社発行、タンパク質実験ノート(上) 139頁以下、第5章 1. Hisタグタンパク質の発現と精製(安光、和久井)、J. A. Bornhorst and J. J. Falke, Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. Methods in Enzymology 326:245-254, (2000)、その他にも、Proteins 41:144-53 (2000)、FEMS Microbiol. Lett. 188:147-51 (2000)、J. Bacteriol. 182: 4304-9 (2000)参照)。本発明において、かかる組合せを用いることができる。

## 【 0 0 5 9 】

His tagが付された蛋白質成分をコードする遺伝子を発現させる場合に、大腸菌(M.W.Van Dyke, M.Sirito, and M.Sawadogo, Gene 111:95, 1992), Saccharom

yces cerevisiae (D.C.Kaslow and J.Shiloach, Bio/Technology 12:494, 1994), mammalian cell (R.Janknecht and A.Nordheim, Gene 121:321, 1992), バキ  
 ュロウイルスが感染した昆虫細胞 (A.Kuusinen, M.Arvola, C.Oker-Blom, and K  
 .Keinanen, Eur. J. Biochem. 233:720, 1995)等の使用例が知られており、適宜  
 使用できる。

【 0 0 6 0 】

一例として、His tagとニッケルカラムによるHis tagを付したタンパク質成分  
 の製造方法の概略を示せば次の通りである。これ以外にも様々なヴァリエーシ  
 ョンが知られており、適宜選択して使用できる。

1. 遺伝子工学的手法により、目的タンパク質のN末にHis tag (6個のHisよ  
 りなる) を結合させた融合タンパク質を得る。
2. タグをつけたタンパク質が発現している細胞を氷中で超音波処理し、ローデ  
 インクバッファー (300 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0) に懸濁する。
3. 細胞の溶解物を遠心分離する (30,000 rpm、4℃で30分間)。
4. 上記で得られた上清に、氷で冷やしたローディングバッファーの中で平衡化  
 した50%のNi<sup>2+</sup>-NTA slurry (Qiagen社製)を加える。4℃で1時間攪拌す  
 る。
5. 樹脂をカラムにロードし、カラム容量の20倍のローディングバッファーで、  
 4℃でカラムの洗浄を行う。
6. カラム容量の20倍のローディングバッファー (10 mM imidazole, pH 8.0を  
 含む) で、4℃でカラムの洗浄を行う。
7. カラム容量の20倍のローディングバッファーを用いて、imidazoleの濃度勾  
 配を10から250 mMになるように設定し、カラムから目的タンパク質の溶出を  
 行う。1 mlずつフラクションを集め、SDS-PAGEで目的タンパク質を含むフラ  
 クションを集める。

【 0 0 6 1 】

B. Thioredoxin とphenylarsine oxide (PAO)

thioredoxin とPAO との結合性を利用する方法であり、目的タンパク質をthio  
 redoxinと融合タンパク質とし、PAO 固定化アガロース (Invitrogen社製ThioBond

<sup>TM</sup> resin) に吸着させ、 $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) で溶出させる(A. Alejo, R. J. Yanez, J. M. Rodriguez, E. Vinuela, and M. L. Salas, African Swine Fever Virus trans-Prenyltransferase. The Journal of Biological Chemistry 272: 9417-9423, 1997参照)。本発明においても、この方法を利用することができる。

【 0 0 6 2 】

以下に、この方法による蛋白質の精製例を示す。

1. 形質転換体(E. coli/ベクター pTrxFus (Invitrogen社製))の終夜培養液を20倍希釈になるように100  $\mu$ g/mlのアンピシリン(終濃度)を含むRM培地(0.6 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.3 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 %  $\text{NaCl}$ , 0.1 %  $\text{NH}_4\text{Cl}$  , 2 % Casamino Acids, 0.0095 %  $\text{MgCl}_2$ )に加え、30℃で培養する。
2.  $A_{550}=0.5$ になるまで培養を続け、融合タンパク質の発現を誘導させるために、100  $\mu$ g/ml tryptophan(終濃度)を加え、34℃でさらに2時間培養する。
3. 遠心分離で菌体を集め、菌体ペレットを5 mlのRunning Buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM  $\text{NaCl}$ , 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] に懸濁し、超音波処理により細胞を破碎する。
4. 細胞懸濁液を遠心分離(10,000 rpm, 15分間)し、上清を集める。
5. 上清に含まれる融合タンパク質と2 mlのThioBond<sup>TM</sup> resinに結合させるために、4℃で60分間インキュベーションする。
6. スラリーをカラムに充填し、カラムの30倍ベットボリュームのRunning Buffer [100 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM  $\text{NaCl}$ , 1 mM EDTA, 20 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] で洗浄する。
7.  $\beta$ -mercaptoethanolの濃度勾配により、Running Bufferで目的タンパク質を溶出する。

【 0 0 6 3 】

(5-2) 抗原又は抗原断片(エピトープタグ)と抗体の結合性を利用する方法

A. T7-tagとT7-tagに特異的なモノクローナル抗体

T7-Tag とは、phage T7由来のgene 10に存在する11個のアミノ酸配列をいい、こ

れに対する抗体との組合せが、タンパク質の精製手段として採用されている。即ち、目的タンパク質の発現に先立ち、遺伝子にT7-TagをコードするDNA配列を結合して発現させ、生成したT7-Tag 融合タンパク質をT7-tagに特異的なモノクローナル抗体を吸着体として捕捉することで精製する方法である。吸着体は、例えば、T7-Tag Antibody Agarose (Novagen社製)が市販されている。溶出にはcitric acid が用いられる。本発明において、かかる組合せを用いることができる。なお、R. Deora, T. Tseng, and T. K. Misra, Alternative Transcription Factor  $\sigma^{SB}$  of *Staphylococcus aureus*: Characterization and Role in Transcription of the Global Regulatory Locus *sa*. *Journal of Bacteriology* 179:6355-6359, 1997参照。

## 【0064】

一例として、T7-tagを付したタンパク質成分の製造方法の概略を示せば次の通りである。これ以外にも様々なヴァリエーションが知られており、適宜選択して使用できる。

1. 20  $\mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールと30  $\mu\text{g/ml}$ のカナマイシンを含んだ2xYT培地 [1.6 % Bact Trypton, 1 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 0.4 % glucose] で形質転換体 (*E. coli*/ベクター-pET (Novagen社製))を培養する。
2. 細胞の懸濁度が $A_{600}=0.6$ になるまで培養し、目的タンパク質の発現を誘導させるためにIPTGを加え、さらに2時間培養する。
3. 遠心分離で菌体を集め、10 mlのice-cold T7-Tag Bind/Wash緩衝液 [4.29 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1 % Tween-20, 0.02 % sodium azide (pH 7.3)] 緩衝液に菌体ペレットを懸濁する。
4. 氷中で細胞懸濁液を超音波処理し、粘性がなくなるまで、細胞を破碎する。
5. 遠心分離 (39,000 rpm, 20分間) で細胞小片を除き、得られた上清を0.45  $\mu\text{m}$ 膜でフィルターろ過する。
6. T7-Tag Bind/Wash緩衝液で平衡化したT7-Tag Antibody Agaroseカラム(N

ovagen社製)に細胞抽出液を供し、同緩衝液でカラムを洗浄し、非特異的に結合したタンパク質を除く。

7. 溶出緩衝液 [0.1 M citric acid (pH 2.2)] で目的タンパク質を溶出する。

【 0 0 6 5 】

B. FLAGペプチドtag(シグマ社商品名) と anti-FLAG antibody(シグマ社商品名)との結合性を利用する方法

FLAGペプチドtag(シグマ社商品名/以下同)は、8乃至23個のアミノ酸からなるペプチドであり、所謂、エピトープタグとして、それに対する抗体と共に蛋白質の精製に利用されている。即ち、N末位にFLAGペプチドtagをもつタンパク質を構築し、FLAG antibody カラムで捕捉する。溶出はFLAG peptideで行う。なお、P. J. Woodring and J. C. Garrison, Expression, Purification,

and Regulation of Two Isoforms of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate 3-Kinase.

The Journal of Biological Chemistry 272: 30447-30454, 1997参照。

【 0 0 6 6 】

下記に、方法の概略を示すが、これ以外にも適宜変更することが可能である。

1. 目的タンパク質が発現した細胞(ホスト: B31 cell (Rat-1 fibroblast cell line)、ベクター: pDouble-Trouble (pDT) mammalian 発現ベクター)を遠心分離で集め、8 mlのプロテアーゼ阻害剤 (10  $\mu$ g/ml calpain inhibitors I and II, 100  $\mu$ g/ml Pefabloc, 2.5  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml aprotinin, 2  $\mu$ g/ml bacitracin, 20  $\mu$ g/ml benzamidin) の入った低張液でホモジナイズする。
2. 遠心分離 (2,000 rpm) で細胞小片や核酸を取り除き、上清を集める。
3. さらに遠心分離し、得られた細胞抽出液を1 mlのFLAG antibody カラムに供し、35 mlのTBSC [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) CHAPS] でカラムを洗浄する。
4. 200  $\mu$ g/mlのFLAG peptideを含んだ5 mlのTBSCで目的タンパク質を溶出する

【 0 0 6 7 】

C. Protein A と IgG

Staphylococcal Protein A (SPA)とその抗体IgG との結合性を利用する方法であり、目的タンパク質をSPAとの融合蛋白とし、IgG Sepharoseカラムで捕捉する。溶出は低pH 緩衝液で行う。なお、B. Nilsson and L. Abrahmsen, Fusion to Staphylococcal Protein A. Methods in Enzymology 185: 144-161, 1990参照。

【 0 0 6 8 】

下記に、方法の概略を示すが、これ以外にも適宜変更することが可能である。

1. 形質転換体(ホスト : E. coliあるいはS. aureus、ベクター : pRIT20あるいはpRIT30シリーズ)の終夜培養液を終濃度が1 %になるように、25 ml のLB培地 (LB培地 + 0.1 % (w/v) glucose, 250 mg/l ampicillin) に加え、37℃で4時間培養する。
2. 遠心分離 (10,000 rpm, 5℃で20分間) で菌体を集め、上清を0.45  $\mu$ m膜でフィルターろ過する。
3. TST [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20] で平衡化した5 mlのIgG Sepharoseカラムに供する。
4. カラムを15 mlのTSTで2回、さらに5 mlの1 mM ammonium acetateで洗浄する。
5. 1 mlの0.5 M ammonium acetate (pH 3.3) で目的タンパク質を溶出する。

【 0 0 6 9 】

D. 蛋白質とMonoclonal antibody

Bovin Retina (網膜) 由来の蛋白質Cyclic nucleotide- gated (CNG) channel をモノクローナル抗体PMc 6E7( $\alpha$ サブユニットのN末領域 ; 63- kDa polypeptide)を用いて精製する方法が知られている(R. S. Molday and L. L. Molday, Purification, Characterization, and Reconstitution of Cyclic Nucleotide- Gated Channels. Methods in Enzymology 294: 246-260, 1999参照)。吸着体としてモノクローナル抗体を定着させたSepharose 2B(ファルマシア社製)が、目的タンパク質の溶出には、6E7 competing peptide (モノクローナル抗体と競合的に結



合するペプチド) Ser- Asn- Lys- Glu- Gln- Glu- Pro- Lys- Glu- Lys- Lys- Lys- Lys- Lysが夫々用いられる。本発明においても、この組合せを利用することが可能である。

【 0 0 7 0 】

以下に、Bovin Retina (網膜) 由来の蛋白質をモノクローナル抗体により精製する方法を示す。

1. Bovin Retina のホモジネートから、30-50 % (w/v) のショ糖密度勾配遠心分離 [20 mM Tris-acetate (pH 7.4), 10 mM glucose, 1 mM  $MgCl_2$ ; 82,500 rpm, 4℃で45分間] により、ROS画分を集めた。
2. ROS画分を5容量のHomogenizing Buffer [20 % (w/v) sucrose, 20 mM Tris-acetate (pH 7.4), 10 mM glucose, 1 mM  $MgCl_2$ ] に希釈し、遠心分離する (20,000 rpm, 4℃で20分間)。
3. ROSペレットを8 mlのHomogenizing Bufferに再懸濁し、ROS粗抽出物とする。
4. ROSを10容量のHypotonic Lysis Buffer [10 mM HEPES- KOH (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM DTT] に懸濁し、遠心分離 (13,000 rpm, 10分間; Sorvall SS-34 rotor) する。
5. 膜ペレットを同上Bufferに懸濁し、洗浄操作をさらに2回繰り返す。
6. ペレットを10 mM HEPES- KOH (pH 7.4) に懸濁する。
7. ROS膜をCHAPS (3 - [3- (Cholamidopropyl) dimethylammonio] -1- propane sulfonate) Solubilization Buffer [10 mM HEPES- KOH (pH 7.4), 10 mM  $CaCl_2$ , 0.15 M KCl, 18 mM CHAPS, 2 mg/ml asolectin (soybean phosphatidylcholine, type IV-S; Sigma) protease inhibitor (0.1 mM diisopropylfluorophosphate, 5  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2  $\mu$ g/ml pepstatin or 20  $\mu$ M Pefabloc SC)] に加え、ゆっくりと攪拌する。
8. 遠心分離 (27,000 rpm, 4℃で30分間) で細胞小片を除く。
9. PMc 6E7を固定化したSephacrose 2Bカラムに20 mlの可溶化したROS膜を供し、10容量のCHAPS Column Buffer [10 mM HEPES- KOH (pH 7.4), 1 mM  $CaCl_2$ , 0.15 M KCl, 12 mM CHAPS, 2 mg/ml asolectin] で洗浄する。
10. 0.1 mg/ml 6E7 competing peptideを含んだCHAPS Column Bufferで目的タン

パク質を溶出する。

【 0 0 7 1 】

(5-3) 蛋白質と蛋白質又はペプチド断片との結合性を利用する方法

A. Strep-TagとStreptavidin、

Strep-Tag (Streptavidinに親和性をもつオリゴペプチド)を付加したタンパク質をstreptavidin-agarose columnでアフィニティ精製する方法は知られている(例えば、A. Skerra and T. G. Schmidt, Use of the Strep-Tag and Streptavidin for Detection and Purification of Recombinant Proteins, Methods in Enzymology 326: 271-311(2000)、BioTechniques 28: 338-344 (2000)参照)。本発明において、かかる組合せを用いることができる。

【 0 0 7 2 】

Strep-TagとStreptavidinとの結合性を利用するタンパク質の精製法であり、Strep-Tagとして、Ala-Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly、Asn-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys (Strep-tag II)等が使用される。Strep-Tagを付した蛋白質はDHFR(ジヒドロ葉酸還元酵素)を無細胞系で合成され、固定化したStreptavidin或いはStrepTactinに吸着させることにより精製される。溶出剤としてはdesthiobiotinが用いられる。

【 0 0 7 3 】

Strep-TagとStreptavidinによる、Strep-Tagを付した蛋白質成分の製法の一例を示せば次の通りである。これ以外にも様々なヴァリエーションが知られており、適宜選択して使用できる。

1. E.coli形質転換体(pASK-IBAベクター使用)の終夜培養液を2リットルの新しいLB培地(終濃度100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む)に加え、OD<sub>550</sub>=0.5になるように22℃で振とう(200 rpm)培養する。
2. 遺伝子の発現を誘導させるために、培養液に200  $\mu$ lの2 mg/mlのanhydrotetracycline溶液(dimethylformamide, DMFに溶解)を加え、さらに3時間インキュベートする。
3. 遠心分離(4,200 rpm、4℃で12分間)で菌体を集め、20 mlの緩衝液P[100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 500 mM sucrose, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA]に懸濁し、

氷上で30分間インキュベートした。

4. 遠心分離 (27,000 rpm、4℃で15分間) によりスフェロプラストを除いた。
5. 得られたペリプラズマ画分を2 lの緩衝液W [100 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA] で一晩透析する。
6. 2 mlのStrepTactin Sepharoseカラムを緩衝液Wで平衡化し、ペリスタポンプ、UV検出器 (A<sub>280</sub>)、フラクションコレクターが付属しているシステムを用いて、タンパク質溶液をカラムに供する。
7. A<sub>280</sub>の値がベースラインになるまで、緩衝液Wでカラムを洗浄する。
8. 目的タンパク質を2.5 mM desthiobiotinを含む緩衝液Wで溶出した。

【 0 0 7 4 】

#### B. S-peptideとS-protein

リボヌクレアーゼSの蛋白部分(S-protein)とペプチド部分(Sペプチド)とは、可逆的に強い結合性を示すことが知られており、その結合性を利用してタンパク質の精製が行われる。即ち、目的タンパク質をS-tag(Sペプチド)を有するタンパク質をとし、固定化S-proteinアガロースで捕捉することができる。溶出は、3M guanidinium thiocyanate; 0.2 M potassium citrate buffer, pH 2; 3 M MgCl<sub>2</sub> 等によりS-tagとS-proteinの結合を切断することにより行われる(R. T. Raines, M. McCormick, T. R. V. Oosbree, R. C. Mierendorf, The S-Tag Fusion System for Protein Purification. Methods in Enzymology 326:362-376, 2000参照)。

【 0 0 7 5 】

下記に方法の概略を示すが、これ以外にも適宜変更が可能である。

1. 目的タンパク質を発現した細胞(ホスト: bacteria, insect, mammalian、ベクター: pET, pBAC (Novagen社))の抽出液にS-proteinアガロース (Novagen) のスラリー2 mlを加え、室温で30分間十分に攪拌する。
2. 遠心分離 (500 rpm, 10分間) し、上清を除く。
3. 目的タンパク質が結合したS-proteinアガロースをBind/Wash緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl, 0.1 % (v/v) Triton X-100] に懸濁する。
4. 遠心分離(500 rpm、 1 0 分間)後、上清を除き、人食的に結合したタンパク

質を除く。

5. S-proteinアガロースのスラリーを1.5容量の溶出緩衝液 [bind/wash buffer + 3 M guanidinium thiocyanate, 0.2 M potassium citrate (pH 2), or 3 M MgCl<sub>2</sub>] に懸濁する。
6. 時々攪拌し、常に懸濁した状態を維持しながら、室温で10分間インキュベートする。
7. 遠心分離後、溶出された目的タンパク質を集める。

【0076】

#### C. Calmodulin-Binding Peptide (CBP)とCalmodulin (CaM))

Calmodulin-Binding Peptide (CBP)とCalmodulin (CaM))との相互作用を利用するタンパク質の精製法である(P. Vaillancourt, Chao-Feng Zheng, D. Q. Hoang, and L. Breister, Affinity Purification of Recombinant Proteins Fused to Calmodulin or to Calmodulin-Binding Peptides. Methods in Enzymology 326: 340-362( 2000)参照)。本発明において、かかる組合せを用いることができる。

【0077】

蛋白質性成分にCBPが結合したCBP融合タンパク質を製造し、Sephacrose 4B-based CaM affinity樹脂、その他市販のCaM樹脂に吸着させ、精製する。溶出にはEGTA (Ca<sup>2+</sup>とキレートを形成する) が用いられる。

【0078】

CBPとCaMによる、CBP融合タンパク質の製法の一例を示す。これ以外にも種々のヴァリエーションがあり、適宜選択して使用できる。

1. 20 mlの形質転換体(ベクターとしてpET-11を基盤として構築されたpCAシリーズを使用)の終夜培養液を50 μg/mlのアンピシリンあるいはcarbenicillinを含む1 lのLB培地に加え、OD<sub>600</sub>=0.6 ~ 1.0になるまで培養する。終濃度が1 mMになるようにIPTGを加え、さらに3~5時間振とう培養する。

2. 菌体を遠心分離で集め、0.2 mg/ml lysozymeを含む緩衝液A [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM 2-mercapto-ethanol, 1 mM magnesium

m acetate, 1 mM imidazole, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ] で細胞ペレットを懸濁し、超音波で細胞を破碎する。

3. 細胞溶解物を遠心分離 (25,000 rpm, 15 分間) し、上清を集める。
4. 10 ml の CaM-Sepharose 樹脂を緩衝液 A で平衡化する。
5. CaM-Sepharose 樹脂と細胞溶解物を混合し、穏やかに 1 時間攪拌する。非特異的結合物質は、低速遠心後スラリーを除くことにより除去する。
6. 40 ml の緩衝液 A で洗浄し、20 - 30 ml の緩衝液 A に再懸濁し、カラムに充填する。さらに、カラムの 5 倍ベッドボリュームの緩衝液 A、続いて緩衝液 B [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM 2-mercapto-ethanol, 1 mM magnesium acetate, 1 mM imidazole, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ ] で UV 検出器の  $A_{280}$  の値がベースラインになるまで洗浄する。
7. 2 mM EGTA を含む緩衝液 B で目的タンパク質を溶出させる。

【0079】

#### D. HSA と ABP

Human Serum Albumin (HAS) と Serum Albumin Binding Affinity Handle (ABP) との結合性を利用して蛋白質を精製する方法が報告されている (T. Graslund, J. Nilsson, A. M. Lindberg, M. Uhlen, and Per-Ake Nygren, Production of a Thermostable DNA Polymerase by Site-Specific Cleavage of A Heat-Eluted Affinity Fusion Protein. Protein Expression and Purification 9: 125-132, 1997 参照)。目的タンパク質を Serum Albumin Binding Affinity Handle (ABP) と融合タンパク質の形で発現させ、これを HSA-Sepharose カラムで捕捉し、低 pH 緩衝液で溶出させる方法である。本発明においても、この組合せを利用することができる。

【0080】

以下に本方法によるタンパク質の精製方法の概要を示す。

1. 形質転換体 (宿主: E. coli、ベクター: pET-21a (Novagen)) の終夜培養液 5 ml を 500 ml の TSB + YE 培地 (30 g/l tryptic soy broth, 5 g/l yeast extract, 100 mg/l ampicillin, 34 mg/l chloramphenicol) に加え、 $\text{OD}_{600} = 0.8 - 1.5$  になるまで振とう培養する。

2. 融合タンパク質の発現を誘導させるために、1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside (終濃度) を加え、さらに3から5時間培養する。
3. 遠心分離で菌体を集め、菌体ペレットをTST [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 M NaCl, 0.05 % Tween 20, 1 mM EDTA] に懸濁し、超音波処理で菌体を破碎する。
4. 破碎された細胞懸濁液を遠心分離 (20,000 rpm, 30分間) し、得られた上清を1.2  $\mu$ m hydrophilic filterでフィルターろ過する。
5. 細胞抽出液をHSA-Sepharoseカラムに供する。
6. 目的タンパク質を0.5 M HAc (pH 2.8) 溶液で溶出する。

【 0 0 8 1 】

(5-4) 蛋白質と特定のアミノ酸、DNA、色素、ビタミン、レクチン等の低分子化合物との結合性を利用する方法

A. グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) とグルタチオン、

GSTとグルタチオンとの相互作用を利用して蛋白質を精製する方法は、GST pull down methodと呼ばれ、通常行われている(例えば、羊土社発行、タンパク質実験ノート(上) 162頁以下、第5章 2. GST融合タンパク質の発現と精製(末武)、D. B. Smith, Generating Fusions to Glutathione S-Transferase for Protein Studies, Methods in Enzymology 326:254-270, (2000)参照)。本発明において、かかる組合せを用いることができる。

【 0 0 8 2 】

目的タンパク質とGSTとの融合タンパク質を製造し、グルタチオン(glutathione-agarose)を吸着体として用いるタンパク質の精製方法である。溶出剤としては還元型グルタチオンが用いられる。GST融合タンパク質を遺伝子工学的手法で製造する場合、E. coli, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe等を宿主細胞として使用する例が知られている。

【 0 0 8 3 】

GSTとグルタチオンによる、GST融合タンパク質の製造方法の一例について、その概略を示せば次の通りである。これ以外にも様々なヴァリエーションが知られており、適宜選択して使用できる。

1. 100 mlの形質転換体終夜培養液を1 lのL培地 (100  $\mu$ g/mlアンピシリン) で希釈する。適当な状態まで培養する。
2. 遠心分離 (5000 rpm) により集めた細胞のペレットを20 mlのice-coldのPBS (還元剤を加えたもの。例えば、1-5 mM dithiothreitol (DTT)あるいは0.1% 2-mercaptoethanol) に懸濁する。
3. 泡立たないように細胞懸濁液を氷上で超音波処理する。約5分間で懸濁液がくすんだ灰色になるような強度に調整する。
4. 終濃度が1%になるようにTriton X-100を加え遠心分離する (10,000 rpm、4℃、5分間)。上清を50 mlのチューブに移し、これに予め膨潤させておいた1 mlの50%グルタチオン-アガロース ビーズを加え、時々反転して攪拌しながら、4℃で30分間インキュベートする。
5. 遠心分離 (500 rpm、30分) でビーズを集め、50 mlのice-coldのPBSで3回洗浄する。
6. 等量の新しく調整した50 mMのTris-HCl (10 mM還元状態のグルタチオン含、pH 8) でビーズを室温で5分間緩やかに攪拌しながら、融合タンパク質を溶出する。
8. 遠心分離 (500 rpm、30秒) で上清を集め、終濃度が10%になるようにグリセロールを加え、小分けした後-80℃で保存する。

【 0 0 8 4 】

#### B. 蛋白質とDye-Ligand

*Zymononas mobilis*由来のnative蛋白質が、特定の色素、C.I. 17908, Reactive Red 8やC.I. Reactive Blue 187に親和性を有し、その性質を利用して該蛋白質を精製する方法が報告されている (R. K. Scopes and K. Griffiths-Smith, Use of Differential Dye-Ligand Chromatography with Affinity Elution for Enzyme Purification: 6-Phosphogluconate Dehydratase from *Zymononas mobilis*. Analytical Biochemistry 136: 530-534, 1984参照)。従って、該蛋白質の全部又は一部で、目的タンパク質をラベルし、上記色素をリガンドとしたSephacrylカラムに吸着させ、アフィニティー溶出させることにより目的タンパク質の精製が可能である。

【 0 0 8 5 】

下記に、*Z. mobilis*由来の蛋白質の精製法を示す。

1. *Z. mobilis*の培養液から、Extraction Bufer [20 mM K-Mes (pH 6.5), 30 mM NaCl, 5 mM  $MnCl_2$ , 0.5 mM ammonium ferrous sulfate, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] を用いて、細胞抽出液を調整する。
2. 細胞抽出液をScarlet MX-G (C.I. 17908, Reactive Red 8) - Sepharose CL-4Bカラム(ファルマシア社製)とBlue HE-G (C.I. Reactive Blue 187) - Sepharose CL-4Bカラムに連続して供する。
3. 100 mlのExtraction Bufferでカラムを洗浄する。
4. Scarlet MX-Gカラムのみを除いて、Blue HE-Gカラムを20 mM  $Na_2SO_4$ を含んだ同上Bufferでさらに洗浄する。
5. 20 mM DL- $\alpha$ -glycerophosphateで*Z. mobilis*由来の目的タンパク質を溶出する。

【 0 0 8 6 】

C. Biotin とAvidinの結合性を利用する方法

ビオチン(Biotin)とアビジン(Avidin)との特異的結合を利用して蛋白質を精製する方法は古くから知られている。例えば、J. D. Alche, and H. Dickinson, Affinity Chromatographic Purification of Antibodies to a Biotinylated Fusion Protein Expression in *Escherichia coli*, Protein Expression and Purification 12:138-143, 1998参照。目的タンパク質→宿主細胞(例えば、*E. coli*)中でビオチン化される配列(122アミノ酸)を用いて、目的タンパク質との融合タンパク質をつくり、これをアビジンを固定したカラム、例えば、SoftLink soft release avidin resin (Promega社製)で捕捉し、biotinで競合的に溶出させる。本発明においても、この組合せを利用することができる。

【 0 0 8 7 】

1. 遺伝子の発現を誘導させるため、形質転換体(ホスト：*E. coli*、ベクター：PinPoint Xa-2 (Promega社製))の終夜培養液に1 mM IPTG (終濃度)を加え、さらに5時間培養した。
2. 発現したタンパク質が封入体中に存在する場合、以下のように処理する。



- 3.1 gの細胞ペレットに対し、10 mlの緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 1 mg/ml lysozyme] で細胞を溶解する。
- 4.遠心分離 (18,000 rpm, 15分間) で目的タンパク質を含む沈殿物を集め、緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, 0.1 mM PMSF] に懸濁し2回洗浄する。
- 5.遠心分離 (18,000 rpm, 15分間) 後、得られたペレットを可溶化緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 6 M guanidine-HCl] に懸濁する。
- 6.30 mlの可溶化緩衝液で平衡化した、3 mlのSoftLink soft release avidin resin (Promega) カラムに、細胞抽出液を供し、60 mlの可溶化緩衝液で洗浄する。
- 7.ビオチン化された目的タンパク質を5 mM biotinを含む可溶化溶液で溶出する。

#### 【 0 0 8 8 】

##### (5-5) 蛋白質と糖との結合性を利用する方法

糖結合性蛋白と糖との相互作用を利用して蛋白質を精製する方法であり、マルトース結合タンパク (MBP) とアミロース (D. Sachdev and J. M. Chirgwin, *Fusions to Maltose-Binding Protein: Control of Folding and Solubility in Protein Purification. Methods in Enzymology* 326: 312-321(2000).) が知られており、他にも、ガレクチンの如き  $\beta$ -ガラクトース結合蛋白質と  $\beta$ -ガラクトースとの相互作用を利用する方法等が考えられる。本発明において、かかる組合せを用いることができる。

#### 【 0 0 8 9 】

##### A. Maltose-Binding Proteinとアミロース

Maltose-Binding Protein融合タンパク質を固定化したアミロース樹脂に吸着させる方法においては、溶出剤としてMaltoseが用いられるMaltose-Binding Protein融合タンパク質の製法の一例を示せば次の通りである。これ以外にも様々なヴァリエーションが知られており、適宜選択して使用できる。

1. 2 mlの形質転換体 (E. coli/ベクターはpMAL-c2 (New England Biolabs製

))の終夜培養液を225 mlの100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLBD培地(0.2 % glucoseを含むLB培地)に加え、OD<sub>600</sub>=0.5になるまで37℃で振とう培養する。

2. 遺伝子の発現を誘導するために、0.3 mM isopropyl- $\beta$ -thiogalacto-pyranoside (IPTG)を加え、30℃でさらに2から3時間培養する。
3. 遠心分離 (6,800 rpm、5分間) で菌体を集め、細胞のペレットを10 mlのカラム緩衝液 [20 mM Tris (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.02 % Tween 80] に懸濁後、-20℃で一晩凍結させる。
4. 凍結した細胞懸濁液を凍りの入った水中で融解させ、10 mlのカラム緩衝液で希釈する。超音波処理 (最大値の75%強度) をして、細胞を破碎する。
5. 遠心分離 (20,000 rpm、4℃で15分間) 後、上清にさらに10 mlのカラム緩衝液を加え希釈する (粗抽出液)。
6. 10 mlのアミロース樹脂カラムに粗抽出液を供する。
7. カラムを20から30 mlのカラム緩衝液で数回洗浄後、10 mM maltoseを含むカラム緩衝液で目的タンパク質を溶出する。

【 0 0 9 0 】

#### B. Chitin とChitin Binding Domain (CBD)

ChitinとChitin Binding Domain (CBD)との結合性を利用するタンパク質の精製方法であり、Intein (inducible self-cleavage activity of engineered protein splicing elements) を介してChitin Binding Domain (CBD)を目的タンパク質に結合させた融合タンパク質を発現させ、これをchitin affinity column (New England Biolabs社)に吸着させる。溶出に際しては、DTT、 $\beta$ -mercaptoethanol、cysteinなどの還元剤で、Inteinと目的タンパク質の連結部分を切断する。例えば、Chung-Mo Park, Jae-Yoon Shim, Song-Sook Yang, Jeong-GuKang, Jeong-Il Kim, Z. Luka, and Pill-Soon Song, Chromophore - Apoprotein Interactions in Synechocystis sp. PCC6803 Phytochrome Cph1. Biochemistry 39: 63 49-6356, 2000参照。本発明の蛋白質成分にこの方法を利用する場合は、CBD-Intein以外の付着性物質でもラベルしておき、該付着性物質のラベルをin vitro合

成系で生成した目的蛋白質との分離のために使用する。

# 【0091】

この方法による蛋白質の精製方法の一例を示せば次の通りである。これ以外にも様々なヴァリエーションが知られており、適宜選択して使用できる。

1. 形質転換体(ホスト: E. coli、ベクター: pTYB2 (New England Biolabs 社))の終夜培養液3 mlを250 mlのRB培地 [0.5 % yeast extract, 1% tryptone, 0.5 % NaCl, 0.2 % glucose (pH 7.5)] に加え、 $OD_{600}=0.6$ になるまで30℃で培養する。
2. 融合タンパク質の発現を誘導するために、1 mM IPTG (終濃度) を加え、さらに20℃で14から16時間培養する。
3. 遠心分離 (5,000 rpm, 5分間) で菌体を集め、菌体ペレットを氷冷Lysis Buffer [Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, 1 mM EDTA] に懸濁し、超音波処理により、細胞を破碎する。
4. 遠心分離 (100,000 rpm, 30分間) で上清を集め、0.2 mmの膜を用いてフィルターろ過する。
5. 細胞抽出液1.5 mlに 2 mM DMSOを20  $\mu$ l加え、氷上で1時間インキュベートし、Chitin Affinity Columnに供する。
6. カラムを緩衝液 [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100] で洗浄し、Inteinのself-cleavageを誘導させるために、1 mM DTT (終濃度) を加えた緩衝液中で、一晚 (4℃) インキュベートする。次いで、遊離した目的タンパク質を採取する。

# 【0092】

(5-6) 蛋白質又はペプチド断片とイオン交換樹脂との結合性を利用する方法

## A. [Poly Arg / Ion exchange]

目的タンパク質をPoly Argタグでラベルするにより、目的タンパク質がプラスに帯電し、陽イオン交換体 (例えば、SP-TSK HPLCカラム) に吸着するようになることを利用したタンパク質の精製方法であり、溶出はイオン強度を調整することにより行われる(J. C. Smith, R. B. Derbyshire, E. Cook, L. Dunthorne, J. Viney, S. J. Brewer, H. M. Sassenfeld, and L. D. Bell, Chemical Synthe

sis and Cloning of a Poly (Arginine) - Coding Gene Fragment Designed to Aid Polypeptide Purification. Gene 32: 321-327, 1984参照)。

【 0 0 9 3 】

上記方法の一例を示せば次の通りである。これ以外にも様々なヴァリエーションが知られており、適宜選択して使用できる。

1. 形質転換体(ホスト : E. coli、ベクター : pWT221)の終夜培養液6 mlを300 mlのM9培地 (100  $\mu$ g/mlアンピシリンを含む) に加え、 $A_{600}=0.4$ になるまで37℃で振とう培養する。
2. 終濃度が20  $\mu$ g/mlになるように、IAA溶液 (20 mg/ml in ethanol) を加える。
3. 0.1 % Polymyxin B (終濃度) を加え、遠心分離で菌体を集める。
4. 菌体ペレットを緩衝液 [40 mM Tris-acetate (pH 5.5), 5 M urea] で溶解し、同緩衝液で透析する。
5. 0.1 mlの細胞抽出液をSP-TSK HPLCカラムに供し、同緩衝液でカラムを洗浄する。
6. NaClの濃度勾配 (100 mM - 350 mM) により、緩衝液 [40 mM PIPES (pH 6.0), 5 M urea] 中に目的タンパク質を溶出する。

【 0 0 9 4 】

(5 - 7) 磁気ビーズを使用する方法

可磁化物質( $\gamma$ - $Fe_2O_3$ と $Fe_3O_4$ )を均一に分布させた高分子ポリマーのコアを親水性ポリマーで覆った、粒子径が均一な磁気ビーズ(magnetic beads)が市販されており(DYNAL社、ノルウエー/商品名 Dynabeads)、この表面に種々の抗体を結合させることにより、磁気ビーズを細胞やタンパク質に結合させることができる。磁気ビーズは強力磁石(MPC)を近づけると磁化されて磁力に引き寄せられ、磁石を離すと磁性を失って元通り分散するという性質を有しており、それを利用して細胞やタンパク質の精製等に利用されている。例えば、Kanegasaki, S. et al, J.Biochem. 117:758-765(1995) においては、CD19抗体でコートされた磁気ポリスチレンビーズ(DYNAL社)を用いて末梢血Bリンパ球を単離している。本発明においても、反応系を構成する蛋白質成分を磁気ビーズでラベルし、磁石により反応

系から除去することが可能である。本発明の、相互に吸着し得る関係にある物質は、かかる磁気ビーズと磁石の如き関係にある物質も包含する。

#### 【0095】

以下に、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、もとよりこれらは例示であり、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【実施例1】

##### 大腸菌のリボソーム調製とS100の抽出

増殖期中間のE. coli A19株の細胞300 gをアルミナ摩砕した。摩砕した細胞を緩衝液A (pH 7.6の10mM HEPES-KOH(ヘプス-水酸化カリウム)、10 mM MgCl<sub>2</sub>(塩化マグネシウム)、50 mM KCl(塩化カリウム)、1 mM DTT(ジチオトレイトール))に懸濁し、アルミナと細胞破砕物を遠心分離 (30,000 rpm、4℃で1時間) して除いた。得られた上清画分に終濃度が1 μg/mlになるようにDNase(デオキシリボソクレアーゼ)を加えた後、4℃で4時間遠心 (100,000g) した。得られた上清画分をS100とした。また、ペレットは緩衝液Aに懸濁しリボソームの粗抽出液とした。このリボソーム粗抽出液を6から36%のショ糖密度勾配にかけ強く結合した(tight-coupled)リボソーム画分を得た。このtight-coupledリボソーム画分を100,000g回転で遠心分離し、そのペレットをリボソーム緩衝液(pH 7.6の20 mM HEPES-KOH、6 mM MgOAc、30 mM NH<sub>4</sub>Cl、7 mM β-mercaptoethanol(メルカプトエタノール))に懸濁しtight-coupledリボソームを調製した。図1にショ糖密度勾配におけるリボソーム画分を示す。

#### 【0096】

#### 【実施例2】

##### 開始因子、延長因子、終結因子の高発現用プラスミドの構築

大腸菌A19より抽出したゲノムを鋳型としてEF-Tuの遺伝子をコードする遺伝子配列をPCR法により増幅し、5' 端にEcoRI、3' 端にBglIIが認識する配列をもったDNA断片を得た。得られたDNA断片をあらかじめEcoRI及びBglIIで切断したプラスミドpQE60 (QIAGEN社製) に挿入し、C末端にHis tag (ヒスタグ) が融合したEF-Tuを高発現させるためのベクターを得た。得られたベクターでE. coli BL21/p REP4を形質転換した。その他延長因子及び開始因子、終結因子を高発現する

ベクターも同様の手法で構築した。表1に使用したベクター、制限酵素、his tag の位置を示す。

【0097】

【実施例3】

アミノアシルtRNAシンテターゼ(ARS)、メチオニンtRNAフォルミラーゼ(MTF)の高発現用プラスミドの構築

大腸菌A19より抽出したゲノムを鋳型としてアラニルtRNAシンテターゼの遺伝子をコードする遺伝子配列をPCR法により増幅し、5' 端にSphI、3' 端にHindIIIが認識する配列をもったDNA断片を得た。得られたDNA断片をあらかじめSphI及びHindIIIで切断したプラスミドpQE30 (QIAGEN社製) に挿入し、N末端にHis tag (ヒスタグ) が融合したアラニルtRNAシンテターゼを高発現させるためのベクターを得た。得られたベクターでE.coli BL21/p REP4を形質転換した。その他のARS及びMTFを高発現するベクターも同様の手法で構築した。表1に使用したベクター、制限酵素、his tag の位置を示す。

【0098】

【実施例4】

T7RNAポリメラーゼの高発現用プラスミドの構築

T7ファージより抽出したゲノムを鋳型としてT7RNAポリメラーゼの遺伝子をコードする遺伝子配列をPCR法により増幅し、5' 端にBamHI、3' 端にPstIが認識する配列をもったDNA断片を得た。得られたDNA断片をあらかじめBamHI及びPstIで切断したプラスミドpQE30 (QIAGEN社製) に挿入し、N末端にHis tag (ヒスタグ) が融合したT7RNAポリメラーゼを高発現させるためのベクターを得た。得られたベクターでE.coli BL21/p REP4を形質転換した。

【0099】

【実施例5】

ヌクレオシドジフォスフェートキナーゼ(NDK)の高発現用プラスミドの構築

大腸菌A19より抽出したゲノムを鋳型としてNDKの遺伝子をコードする遺伝子配列をPCR法により増幅し、5' 端にBamHI、3' 端にHindIIIが認識する配列をもったDNA断片を得た。得られたDNA断片をあらかじめBamHI及びHindIIIで切断した

プラスミドpQE30 (QIAGEN) に挿入し、N末端にHis tag (ヒスタグ) が融合したNDKを高発現させるためのベクターを得た。得られたベクターでE.coli BL21/pREP4を形質転換した。

【0100】

#### 【実施例6】

#### 開始因子、延長因子、終結因子の高発現と精製

His tagが付されたEF-Tu(EF-Tu<sup>\*</sup>)を高発現させるために、実施例2で得られた形質転換体BL21/pREP4細胞を6リットルのLB培地で細胞懸濁度OD<sub>660</sub>が0.7になるまで培養した。この培養液に終濃度が0.1 mMになるようにIPTG (イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド; isopropyl-1-thio-β-D-galactoside) を添加し、さらに37℃で4時間培養した。この培養液を遠心分離し、得られた細胞を懸濁緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M NH<sub>4</sub>Cl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.3 mg/ml リゾチーム、0.1 % Triton X-100、0.2 mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド; phenylmethanesulfonyl)、6 mM β-mercaptoethanol) に懸濁した。この懸濁液を超音波処理し、細胞を破壊した。超音波処理した懸濁液を4℃で1時間遠心分離 (100,000 rpm) し、細胞破砕物を除いた。得られた上清画分をNi<sup>2+</sup>でプレチャージされた10 mlのHi-Trap chelatingカラム (ファルマシア社製) に供し、10 mMのimidazole (イミダゾール) を含む100 mlのHT緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M NH<sub>4</sub>Cl、10 mM MgCl<sub>2</sub>) で洗浄した。HT緩衝液に含まれるimidazole濃度を10から400 mMまで直線的に勾配をつけて、EF-Tu<sup>\*</sup>をカラムから溶出した。精製されたEF-Tu<sup>\*</sup>を含む画分を合わせて、Stock緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、100 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、30 % glycerol (グリセロール)) で透析した。精製したEF-Tu<sup>\*</sup>の濃度はBio-Rad社のProtein Assay Kitを用いてBSA (ウシ血清アルブミン) を基準に作成した標準曲線から算出した。精製したEF-Tu<sup>\*</sup>は1mlずつ小分けして液体窒素で急冷凍した後-80℃で保存した。その他のHis tagが付された延長因子及び開始因子、終結因子も同様の手法で精製を行った。His tagが付された各因子の12%SDS-PAGEによる分離(クマシーブリリアントブルーで染色)を図2に示す。

【0101】

得られた、His tagが付された開始因子IF1、IF2及びIF3(His tagが付されていることを「\*」で示す)の活性と至適濃度をDHFR mRNA in vitro翻訳系(後記実施例17)を用いて測定した。即ち、His tagが付された開始因子の活性は、IF1\*、IF2\*及びIF3\*が共に存在する系をポジティブコントロールとし、各開始因子を欠如させた系で30分間の培養を行い、生成したDHFRの相対的活性で比較した(図3A参照)。ポジティブコントロールを100とした時、何れの因子が欠如してもDHFRの生成は2分の1以下であり、IF1\*、IF2\*及びIF3\*が何れも活性を有することが確認された。また、His tagが付された開始因子の至適濃度は、他の条件を一定にしたin vitroの系で、各開始因子の濃度を変えて翻訳を行い、生成したDHFRの相対活性で測定した(図3B参照)。図3Bにおいて、●はIF1\*を、▲はIF2\*を、■はIF3\*を意味する。

【0102】

#### 【実施例7】

##### His tagが付されたARS及びMTFの高発現と精製

His tagが付されたSer tRNAシンテターゼ(以下において、His tagが付されていることを、「\*」で示す)を高発現させるための形質転換体BL21/pREP4細胞を2リットルのLB培地で細胞懸濁度OD<sub>660</sub>が0.7になるまで培養した。この培養液に終濃度が0.1 mMになるようにIPTG (イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド; isopropyl-1-thio-β-D-galactoside) を添加し、さらに37℃で4時間培養した。この培養液を遠心分離し、得られた細胞を懸濁緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M NH<sub>4</sub>Cl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.3 mg/ml リゾチーム、0.1 % Triton X-100、0.2 mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド; phenylmethanesulfonyl)、6 mM β-mercaptoethanol) に懸濁した。この懸濁液を超音波処理し、細胞を破壊した。超音波処理した懸濁液を4℃で1時間遠心分離 (100,000 rpm) し、細胞破砕物を除いた。得られた上清画分をNi<sup>2+</sup>でプレチャージされた10 mlのHi-Trap chelatingカラム (ファルマシア社製) に供し、10 mMのimidazole (イミダゾール) を含む100 mlのHT緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M NH<sub>4</sub>Cl、10 mM MgCl<sub>2</sub>) で洗浄した。HT緩衝液に含まれるimidazole濃度を10から400 mMまで直線的に勾配をつけて、Ser tRNAシンセターゼ\*をカラムから溶出した。精



製されたSer tRNAシンセターゼ\*を含む画分を合わせて、Stock緩衝液（pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、100 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、30 % glycerol（グリセロール））で透析した。精製したSer tRNAシンセターゼ\*の濃度はBio-Rad社のProtein Assay Kitを用いてBSA（ウシ血清アルブミン）を基準に作成した標準曲線から算出した。精製したSer tRNAシンセターゼ\*は1mlずつ小分けして液体窒素で急冷凍した後-80℃で保存した。得られたSer tRNAシンセターゼ\*のクロマトグラムを図5に示す。

#### 【0103】

その他のARS\*、MTF\*も同様の手法で精製を行った。12% SDS-PAGE により分離されクマシーブリリアントブルーで染色された、His-tagが付された各因子及び酵素を図6に示す。図6において、Gly RS\*及びPhe RS\*の2本のバンドは、これ等の酵素に $\alpha_2\beta_2$ のタイプがあることに因る。図6から、His-tagが付された各因子及び酵素が高純度で得られたことがわかる。

#### 【0104】

#### 【実施例 8】

#### His-tagが付されたT7 RNAポリメラーゼの高発現と精製

His-tagが付されたT7 RNAポリメラーゼ（以下において、His tagが付されていることを、「\*」で示す）を高発現させるための形質転換体BL21/pREP4細胞を6リットルのLB培地で細胞懸濁度OD<sub>660</sub>が0.7になるまで培養した。この培養液に終濃度が0.1 mMになるようにIPTG（イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド；isopropyl-1-thio-β-D-galactoside）を添加し、さらに37℃で4時間培養した。この培養液を遠心分離し、得られた細胞を懸濁緩衝液（pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M NH<sub>4</sub>Cl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.3 mg/ml リゾチーム、0.1 % Triton X-100、0.2 mM PMSF（フェニルメタンサルホニルフルオリド；phenylmethanesulfonyl）、6 mM β-mercaptoethanol）に懸濁した。この懸濁液を超音波処理し、細胞を破壊した。超音波処理した懸濁液を4℃で1時間遠心分離（100,000 rpm）し、細胞破砕物を除いた。得られた上清画分をNi<sup>2+</sup>でプレチャージされた10 mlのHi-Trap chelatingカラム（ファルマシア社製）に供し、10 mMのimidazole（イミダゾール）を含む100 mlのHT緩衝液（pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M NH<sub>4</sub>Cl

、10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) で洗浄した。HT緩衝液に含まれるimidazole濃度を10から400 mMまで直線的に勾配をつけて、T7RNAポリメラーゼ\*をカラムから溶出した。精製されたT7RNAポリメラーゼ\*を含む画分を合わせて、Stock緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、100 mM KCl、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、30 % glycerol (グリセロール)) で透析した。精製したT7RNAポリメラーゼ\*の濃度はBio-Rad社のProtein Assay Kitを用いてBSA (ウシ血清アルブミン) を基準に作成した標準曲線から算出した。精製したT7RNAポリメラーゼ\*は1mlずつ小分けして液体窒素で急冷凍した後-80℃で保存した。得られたT7RNAポリメラーゼ\*のクロマトグラムを図12A及びBに示す。

【0105】

#### 【実施例9】

##### His tagが付されたNDK、その他酵素類の高発現と精製

His tagが付されたNDK(以下において、His tagが付されていることを、「\*」で示す)を高発現させるための形質転換体BL21/pREP4細胞を2リットルのLB培地で細胞懸濁度 $\text{OD}_{660}$ が0.7になるまで培養した。この培養液に終濃度が0.1 mMになるようにIPTG (イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド; isopropyl-1-thio-β-D-galactoside) を添加し、さらに37℃で4時間培養した。

この培養液を遠心分離し、得られた細胞を懸濁緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.3 mg/ml リゾチーム、0.1 % Triton X-100、0.2 mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド; phenylmethanesulfonyl)、6 mM β-mercaptoethanol) に懸濁した。この懸濁液を超音波処理し、細胞を破壊した。超音波処理した懸濁液を4℃で1時間遠心分離 (100,000 rpm) し、細胞破砕物を除いた。得られた上清画分を $\text{Ni}^{2+}$ でプレチャージされた10 mlのHi-Trap chelatingカラム (ファルマシア社製) に供し、10 mMのimidazole (イミダゾール) を含む100 mlのHT緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) で洗浄した。HT緩衝液に含まれるimidazole濃度を10から400 mMまで直線的に勾配をつけて、NDK\*をカラムから溶出した。精製されたNDK\*を含む画分を合わせて、Stock緩衝液 (pH 7.6の50 mM HEPES-KOH、100 mM KCl、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、30 % glycerol (グリセロール)) で透析した。精製したNDK\*の濃度はBio-Rad社

のProtein Assay Kitを用いてBSA（ウシ血清アルブミン）を基準に作成した標準曲線から算出した。精製したNDK\*は1mlずつ小分けして液体窒素で急冷凍した後-80℃で保存した。その他のHis tagが付された酵素も同様にして得られる。

【0106】

#### 【実施例10】

##### DHFRの遺伝子構築とmRNAの調製

E.coli由来のDHFR (dihydrofolate reductase; ジヒドロ葉酸レダクターゼ) 遺伝子の5' 末端にHindIII、3' 末端にBam HI配列を加えPCRで増幅した。この増幅された遺伝子はT7 RNAポリメラーゼのプロモーターとリボソーム結合のためにT7 gene 10 (バクテリオファージT7のgene10) をSD (Shine-Dalgarno; シャイン-ダルガノ) 配列の下流に配置させた。このDNA断片をプラスミドベクターpUC18 (宝酒造) に組み込んだ。このプラスミドをSma Iで処理した後、His tagが付されたT7 RNAポリメラーゼを用いたランオフ転写(run-off transcription)や転写・翻訳型 (transcription/translation) in vitro翻訳反応に鋳型として用いた。In vitroの転写反応42℃で3時間行った。この反応液1 ml中の組成はpH 7.8のHEPES-KOH、20 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM spermidine (スペリミジン)、5 mM DTT、各2 mM ATP、UTP、CTP、GTP、20 μgのSma Iで処理された鋳型プラスミド、50 μg BSA、1.78 units PPIase (pyrophosphatase; ピロホスファターゼ)、10 μgの精製され、His tagが付されたT7 RNAポリメラーゼである。この反応を終了させるために終濃度が50 mMになるようにEDTA (ethylenedinitro - lotetraacetic acid; エチレンジニトロ四酢酸) を加えた。得られたmRNAはフェノール/クロロホルム抽出を行った後、エタノールで沈殿させ、RNA精製キット (QIAGEN社製) を用いてメーカーの推奨する方法に従って精製を行った。

【0107】

#### 【実施例11】

##### MFL mRNAの構築

DNA配列AUGUUCUUGUAA (翻訳するとfMet-Phe-Leu-Stop; ホルミルメチオニニーフェニルアラニン-ロイシン-停止コドンになる。以下、MFLと略記する) を、MFL mRNAの鋳型とするために以下に示すような方法で構築した。オリゴヌクレオ

チドA ; 5'-TatgttcttgtaacとオリゴヌクレオチドB ; 5'-TCGAgttacaagaacaをア  
ニールさせNde I配列とXho I配列を含む二本鎖DNAを構築し、T7ターミネーター  
を含むプラスミドベクターpET29a (Novagen) のNde IとXho I部位へ連結した。  
得られたプラスミドは上述のDHFR遺伝子を同様に転写させた。

【0108】

【実施例12】

His tagが付されたアミノアシルtRNAシンテターゼ活性

His tagが付されたARS (アミノアシルtRNAシンテターゼ) 活性測定は以下に示  
す通りに行った。反応溶液50  $\mu$ lはpolymix緩衝液 (翻訳実験の項を参照のこと  
) に1 mM ATP、2.8 A<sub>260</sub> unit tRNAmix (Boehringer社製)、各50  $\mu$ Mのラベル  
されたアミノ酸、そして精製された各His tagが付されたARSを含んだものを用い  
た。反応は37℃で行い、放射性アミノアシルtRNAを3MMろ紙に沈殿させ5%の非  
放射性トリクロロ酢酸で洗浄した後、放射能を測定した。活性1 unitは、37℃で  
1分間に1 pmolのアミノアシルtRNAの形成を触媒した酵素量で表した。結果を表  
2に示す。

【0109】

【実施例13】

His tagが付されたメチオニルtRNAトランスホルミラーゼ活性

His tagが付されたMTF (メチオニルtRNAトランスホルミラーゼ/以下において  
、His tagが付されていることを、「\*」で示す) 活性は以下に示す通りに行った  
。反応溶液50  $\mu$ lはpolymix緩衝液 (翻訳実験の項を参照のこと) に1 mM ATP、2  
.8 A<sub>260</sub> unit tRNAmix (Boehringer)、各50  $\mu$ Mの [<sup>3</sup>H] ラベルされたメチオニン  
、0.5  $\mu$ g 10-formyl-5,6,7,8,-tetrahydrofolic acid (テトラヒドロ葉酸)、3  
000 units MetRS (メチオニルtRNAシンテターゼ)、そしてMTF\*を含んだものを用  
いた。反応は37℃で行い、ホルミル化されていないメチオニルtRNAは緩衝液  
(0.175 M CuSO<sub>4</sub>, pH 7.5の0.5 M Tris-HCl) 中で30℃、8分間脱アシル化させ  
た。放射性ホルミルメチオニルtRNAを3MMろ紙に沈殿させ5%の非放射性トリクロ  
ロ酢酸で洗浄した後、放射能を測定した。活性1 unitは1分間に1 pmolのホルミ  
ルメチオニルtRNAの形成を触媒した酵素量で表した。結果を表2 (末行)に示す。

【 0 1 1 0 】

## 【実施例14】

翻訳実験（一般的方法）

翻訳用の混合液（50  $\mu$ l）はJelencら（1979）やWagnerら（1982）の用いたPolymix緩衝液を改良したもので調製する。Polymix緩衝液の組成は5 mM magnesium acetate（酢酸マグネシウム）、pH 7.3の5 mM potassium phosphate（リン酸カリウム）、95 mM potassium glutamate（グルタミン酸カリウム）、5 mM ammonium chloride（塩化アンモニウム）、0.5 mM calcium chloride（塩化カルシウム）、1 mM spermidine、8 mM putrescine（プトレッシン）、1 mM DTTである。反応液の組成は1 mM ATP、1 mM GTP、10 mM creatine phosphate（クレアチンリン酸）、2.8 A<sub>260</sub> unit tRNA mix、0.5  $\mu$ g 10-formyl-5,6,7,8,-tetrahydrophilic acid、0.1 mM各アミノ酸、因子混合物（後述）である。転写・翻訳型で反応を行わせる場合には、上記の反応液に1 mM NTPと4 mM magnesium acetateを添加する。因子・酵素混合物の組成は12 pmolリボソーム、1  $\mu$ g IF1<sup>\*</sup>、2  $\mu$ g IF2<sup>\*</sup>、0.75  $\mu$ g IF3<sup>\*</sup>、1  $\mu$ g EF-G<sup>\*</sup>、2  $\mu$ g EF-T<sup>\*</sup>u、1  $\mu$ g EF-Ts<sup>\*</sup>、0.5  $\mu$ g RF1<sup>\*</sup>、0.5  $\mu$ g RF3<sup>\*</sup>、0.5  $\mu$ g RRF<sup>\*</sup>、30-300 units各ARS<sup>\*</sup>あるいはMTF<sup>\*</sup>、0.2  $\mu$ g creatine kinase（CK；クレアチンキナーゼ）、0.15  $\mu$ g myokinase（MK；ミオキナーゼ）、0.054  $\mu$ g nucleoside diphosphate kinase<sup>\*</sup>（NDK；ヌクレオシド二リン酸キナーゼ）である。転写・翻訳型で反応を行う場合には、上記の反応液に1.78 units PPIaseと0.5  $\mu$ g T7 RNAポリメラーゼ<sup>\*</sup>を添加する。以上の因子、酵素の表示において「<sup>\*</sup>」は、それ等がHis-tagが付されたものであることを示す。反応液を37℃で5分間インキュベートし、その後、DNAやRNAなどの鋳型を加え、反応を開始する。翻訳の反応は37℃で行なわれる。S30システムはPromega社から購入したものを使用し、メーカーの推奨する方法に従って翻訳を行う。反応後、リボソームは高分子量であるのでそれをまず100kDa以下の物質を通す限外ろ過膜に通し、除去する。その後限外ろ過膜を通った成分をNiカラムに通し、ヒスタグヒュージョンタンパク質の除去を行う。Niカラムを素通りする成分は高純度の翻訳産物であり、SDS-PAGEで1本のバンドを示す。

【 0 1 1 1 】

## 【実施例15】

Poly (U) - poly (Phe)合成

Poly (U) - poly (Phe)のin vitro反応系における合成は以下に示した通りに行った。反応液は1 mM ATP、1mM GTP、10 mM creatine phosphate、2.8 A<sub>260</sub> units tRNAmix、1 mM [<sup>14</sup>C]でラベルされたフェニルアラニン、因子混合物を含むpolymix緩衝液を用いた。因子混合物の組成は12 pmolリボソーム、1 μg EF-G<sup>\*</sup>、2 μg EF-Tu<sup>\*</sup>、1 μg EF-Ts<sup>\*</sup>、60 units PheRS<sup>\*</sup>、0.2 μg creatine kinase (CK)、0.15 μg myokinase (MK)、0.054 μg nucleoside diphosphate kinase<sup>\*</sup> (NDK)である。なお、因子、酵素の表示において「<sup>\*</sup>」は、それ等がHis-tagの付されたものであることを示す。反応液を37℃で5分間インキュベートした後、5 μgのpoly (U)を加え、反応を開始した。Poly (Phe)を経時的に8 μlずつサンプリングし、10 %のトリクロロ酢酸で3MMろ紙上に沈殿させた。アミノアシルtRNAを85℃で脱アシル化させ10 %トリクロロ酢酸で洗浄し、放射能を測定し、目的物の生成を確認した。

## 【0112】

上記翻訳反応を行う中で、EF-G<sup>\*</sup>、EF-Tu<sup>\*</sup>及びEF-Ts<sup>\*</sup>の至適濃度を調べるために、他の条件を一定にしたin vitro 反応系において、各延長因子の濃度を変えてpoly (Phe)の生成量を調べ、図7 (A)に示す結果を得た。

## 【0113】

更に、本発明の上記反応系によるpoly (Phe)の生成を、S100抽出物を用いた翻訳系によるpoly (Phe)の生成と比較して、図7(B)の結果を得た。後者の系(○)では反応が20分後に停止したが、本発明の系(●)では40分経過後においてなお反応が進行した。

## 【0114】

## 【実施例16】

終結因子とリボソーム再生因子の活性

終結因子 (RF1<sup>\*</sup>、RF3<sup>\*</sup>とRRF<sup>\*</sup>／「<sup>\*</sup>」は、His tagが付されていることを示す)の活性は、改良を加えたPavlovら (1997) の方法に基づき測定した。翻訳反応液 (50 μl)は翻訳実験に用いたpolymix緩衝液を元に調製した。反応液の組成は1 mM

ATP、1 mM GTP、2.8 A<sub>260</sub> unit tRNA mix、1 mM フェニルアラニン及びロイシン、[<sup>35</sup>S] 放射性メチオニンを用いて調製した50pmolのformyl methionyl-tRNA、His tagが付された因子・酵素混合物（後述）である。因子・酵素混合物の組成は12 pmol リボソーム、1  $\mu$ g IF1<sup>\*</sup>、2  $\mu$ g IF2<sup>\*</sup>、0.75  $\mu$ g IF3<sup>\*</sup>、1  $\mu$ g EF-G<sup>\*</sup>、2  $\mu$ g EF-Tu<sup>\*</sup>、1  $\mu$ g EF-Ts<sup>\*</sup>、0.5  $\mu$ g RF1<sup>\*</sup>、0.5  $\mu$ g RF3<sup>\*</sup>、0.5  $\mu$ g RRF<sup>\*</sup>、50 unitのPheRS<sup>\*</sup>と300 unitのLeuRS<sup>\*</sup>である。この因子・酵素混合物からRF1<sup>\*</sup>、RF3<sup>\*</sup>、RRF<sup>\*</sup>を目的に応じてそれぞれ除いた反応液を用意し反応を行った。反応液を37℃でプレインキュベーションした後に1  $\mu$ gのMFL mRNAを加えて翻訳反応をスタートさせた後、この反応液から経時的に5  $\mu$ lずつサンプリングし、等量の1 N HClに加えて反応を止めた。さらにこれに200  $\mu$ lの酢酸エチルを加えてトリペプチド (fMFL) を溶出させ、液体シンチレーションカウンターを用いて放射能を測定した。

## 【0115】

得られた、終結因子RF1<sup>\*</sup>、RF3<sup>\*</sup>及びRRF<sup>\*</sup>の活性を、fMet-Phe-Leu-Stop (fMFL) をコードする合成mRNAのin vitro翻訳系を用いて測定した。即ち、終結因子として、RF1<sup>\*</sup>、RF3<sup>\*</sup>及び RRF<sup>\*</sup> を含む系(●)、RF1<sup>\*</sup>及びRRF<sup>\*</sup>を含む系 (×)、RF1<sup>\*</sup>、及びRF3<sup>\*</sup>を含む系 (▲)、RF1<sup>\*</sup>のみを含む系 (■)、 RF3<sup>\*</sup>及びRRF<sup>\*</sup>を含む系 (○)、何れの終結因子<sup>\*</sup>も(RRF<sup>\*</sup>も)含まない系(◆)の夫々においてfMFL mRNAを翻訳させ、生成量を測定した。結果を図4に示す。図4において、最初のサイクルにより生成したペプチドは、y軸上で約1000cpmに相当する。RF1<sup>\*</sup>、RF3<sup>\*</sup>及び RRF<sup>\*</sup> を含む系(●)が時間の経過と共に直線的に生成量が増し、他の系との比較から、RF1<sup>\*</sup>、RF3<sup>\*</sup>及び RRF<sup>\*</sup> が活性を有することが確認された。なお、RF1<sup>\*</sup>を欠如する系(○)ではペプチドの生成は見られず、また、RRF<sup>\*</sup>を欠如する系(▲■◆)ではリボソームの再循環(recycling)が起こらないことを示している。

## 【0116】

## 【実施例17】

## DHFRの合成

本発明のin vitro 翻訳系及びS-30抽出物をつ用いた翻訳系の夫々により、[<sup>35</sup>S] でラベルされたメチオニンを含むDHFRを合成した。生成物を12 %のSDS-PAGE(

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動)で分離させ、BAS-1000 system (Fuji film) で検出し、放射能を測定した。SDS-PAGEによる分離の結果を、図 8 (A)に示す。

一方、DHFRの活性は以下に示した方法で測定した。pH 7.0の50 mM potassium phosphate緩衝液、50  $\mu$ M DHF (dihydrofolic acid; ジヒドロ葉酸)、60  $\mu$ M NADPH (reduced nicotinamide adnine dinucleotide phosphate; 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリ酸)を含む反応液中、30℃で反応させ、 $A_{340}$ 減少値を1分ごとに測定した。結果を図 8 (B)に示す。

#### 【0117】

本発明のin vitro 翻訳系及びS-30抽出物をつ用いた翻訳系の夫々における反応の経過を図9に示す。本発明のin vitro 翻訳系(■)においては、反応が120分経過後においても進行しているのに対し、S-30抽出物をつ用いた翻訳系(●)においては20分でDHFRの生成量がピークに達している。

#### 【0118】

##### 【実施例18】

##### エネルギー消費

ヌクレオシド三リン酸の加水分解の測定は、本発明のin vitro 翻訳系と、S-30抽出物を用いた翻訳系とを対比しながら、以下に示した通りに行った。DHFRを鋳型とし、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ あるいはGTPを含む反応液を用い、37℃で翻訳実験を行った。この反応液から経時的に2  $\mu$ lずつサンプリングし150  $\mu$ lの10%ギ酸に加えた。Polyethyleneimine TLC plateに反応液をスポットし、pH 3.75のpotassium phosphate緩衝液を用いて反応生成物を展開した。このTLC plateを風乾した後ラップで覆い、オートラジオグラフをとった。結果を図10に示す。図中、左側がS-30の系であり、右側が本発明の系である。S-30の系では、ATPの量が時間の経過と共に減少するのに対し、本発明の系では、ほぼ一定の水準を保っている。

#### 【0119】

##### 【実施例19】

バリルサプレッサーtRNAによるバリン残基の導入 (非天然アミノ酸導入のモデル

〕



His tagが付されたRF1(以下、His tagが付されていることを、「\*」で示す)の代わりにRF2\*を終結因子として用いた本発明のin vitro翻訳系において、化学的に合成したバリルサプレッサーtRNAを用いて37番残基のアスパラギン(ATAコドン)をUAGコドンに置換したDHFRの鋳型を翻訳させた。その結果RF1\*を含むサンプルでは37番目の残基で終結反応が行われ途中で止まったタンパク質ができたのに対し(図11のレーン2)、RF1\*を除くと(RF2は含まない)途中で切れたタンパク質のバンドが薄くなった(図11のレーン3)。さらにここにRF2\*を導入すると通常のDHFR(図11のレーン1)と同様の位置にタンパク質が生産されるようになった(図11のレーン4)。このことからサプレッサーtRNAに結合したバリン残基がDHFRの37番目に導入されたことが確かめられた。

#### 【0 1 2 0】

##### 【発明の効果】

反応系を構成する蛋白質成分をラベルすることにより、反応系を構成するの各蛋白質成分の精製が確実に行われ、未知の成分が入り込まない反応系が確立でき、且つ、生成した目的タンパク質が容易に、しかも極めて高純度で単離出来るすることが可能となった。

#### 【0 1 2 1】

細胞や細胞抽出液に含まれているリポポリサッカライド(LPS)は、内毒素として、生体に対し種々の好ましくない作用をすることが指摘されてきたが、目的生成物であるペプチドと分離することが難しいという技術的な問題があった。しかし、本発明のin vitroペプチド合成系によれば、かかる問題が払拭される。

#### 【0 1 2 2】

未知の成分が入り込まない反応系が確立できることにより、長時間の反応継続が可能となり、バッチ式で2時間或いはそれ以上反応が継続する。又、反応液のボリュームを増すことも可能性となった。例えば、リッタースケールで実施することも理論上可能であると考えられる。

#### 【0 1 2 3】

flow式によれば更に長時間の反応継続が可能となり、in vitro 反応系による蛋白質の生産・精製が実用化され得る。このことは、今までコストが高いが故に

治療に供することが躊躇されがちであったある種の酵素類が安価に供給される道を拓くことを意味し、デリバリーについて技術的問題を抱えている遺伝子治療の少なくとも一部に代えて、酵素類の投与による治療領域を広げるものと期待される。

## 【 0 1 2 4 】

本発明により、終結因子のある系とない系が明確に樹立でき、リボソームディスプレイの選択的製造が容易となり、又、非天然型アミノ酸残基を所望の位置に導入することがより正確に行えるようになった。

## 【 0 1 2 5 】

従来の、原核細胞抽出液を用いる無細胞蛋白合成系では、転写と翻訳を同時に行わせない場合は、mRNAの安定性が大きく下がるという問題があるが、本発明の反応系においては、mRNAを翻訳させる場合においても安定した反応が進行する。

## 【 0 1 2 6 】

ゲノム解析が終了し、遺伝子解析に研究の中心が移ろうとしている時、本発明の反応系により、遺伝子の発現と生成蛋白の確認が迅速に行われ得ることは、遺伝子の機能を調べるのが容易となる等、科学技術の進歩に与えるメリットが極めて高い。

## 【 0 1 2 7 】

【表 1】

Enzymes or factors	vector	N-terminal R.E.	C-terminal R.E.	site of His-tag
AlaRS	pQE30	<i>Sph</i> I	<i>Hind</i> III	N
ArgRS	pET16b	<i>Nde</i> I	<i>Bam</i> H I	N
AsnRS	pQE30	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III	N
AspRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
CysRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
GlnRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
GluRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
GlyRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
HisRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
IleRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Hind</i> III	N
LeuRS	pET21a	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I	C
LysRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
MetRS	pET21a	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I	C
PheRS	pQE30	<i>Sph</i> I	<i>Hind</i> III	N
ProRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
SerRS	pET21a	<i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I	C
ThrRS	pQE30	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III	N
TrpRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
TyrRS	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
ValRS	pET21a	<i>Xba</i> I	<i>Not</i> I	C
MTF	pET21a	<i>Nde</i> I	<i>Xho</i> I	C
IF1	pQE30	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III	N
IF2	pQE30	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III	N
IF3	pQE30	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III	N
EF-G	pQE60	<i>Mun</i> I	<i>Bgl</i> II	C
EF-Tu	pQE60	<i>Eco</i> R I	<i>Bgl</i> II	C
EF-Ts	pQE60	<i>Nco</i> I	<i>Bam</i> H I	C
RF1	pQE60	<i>Bam</i> H I	<i>Hind</i> III	C

註：RE は制限酵素を意味する

【0128】

【表 2】

Enzyme	Concentration ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Specific activity ( $\text{U}/\mu\text{g}$ )	Necessary units (50 $\mu\text{l}$ reaction)
AlaRS	13	27	94
ArgRS	10	1300	130
AsnRS	30	ND	ND
AspRS	22	310	130
CysRS	25	500	31
GlnRS	36	330	63
GluRS	26	150	94
GlyRS	30	520	250
HisRS	30	1600	31
IleRS	20	63	130
LeuRS	22	940	190
LysRS	35	580	190
MetRS	27	3000	310
PheRS	23	15	63
ProRS	16	120	63
SerRS	17	1000	94
ThrRS	19	200	63
TrpRS	11	600	31
TyrRS	22	1800	31
ValRS	20	1700	156
MTF	12	230	230

【0129】

## [Reference]

ADDIN ENBbu Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D., and Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31, 371-87.

Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J Chromatogr* 411, 177-84.

Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.

## 【図面の簡単な説明】

【図 1】 大腸菌リボソームのショ糖密度勾配における画分を示す。

【図 2】 His tag が付された開始因子、延長因子及び終結因子の12% SDS-PAGEにおける分離（クマシーブリリアントブルーで染色）を示す。

【図 3】 Aには、His tagが付された開始因子の活性をDHFRの相対的活性で示し、Bには、His tagが付された開始因子の至適濃度をDHFRの相対的活性で示す。

【図 4】 His tagが付された終結因子の活性をfMFLの生成量で示す。

【図 5】 His tagが付されたSerRS のクロマトグラムを示す。

【図 6】 His tagが付された各ARS及びMTFの12% SDS-PAGEにおける分離を示す。

【図 7】 Aには、本発明のin vitro poly(Phe)合成系における、His tagが付された延長因子の至適濃度をPheの取込量で示し、Bには、本発明のin vitro合成系とS100抽出物を用いた系におけるpoly(Phe)合成反応の進行経過をPheの取込量で示す。

【図 8】 Aには、本発明のin vitro合成系とS100抽出物を用いた系により合成された、 $[^{35}\text{S}]$  Met含有DHFRの12% SDS-PAGEにおける分離を示し、Bには、同DHFRの活性を示す。

【図 9】 本発明のin vitro合成系とS100抽出物を用いた系におけるDHFR合成反応の時間経過を示す。

【図10】 本発明のin vitro合成系(右)とS100抽出物を用いた系(左)における、エネルギー源の消費を時間経過と共に示す。

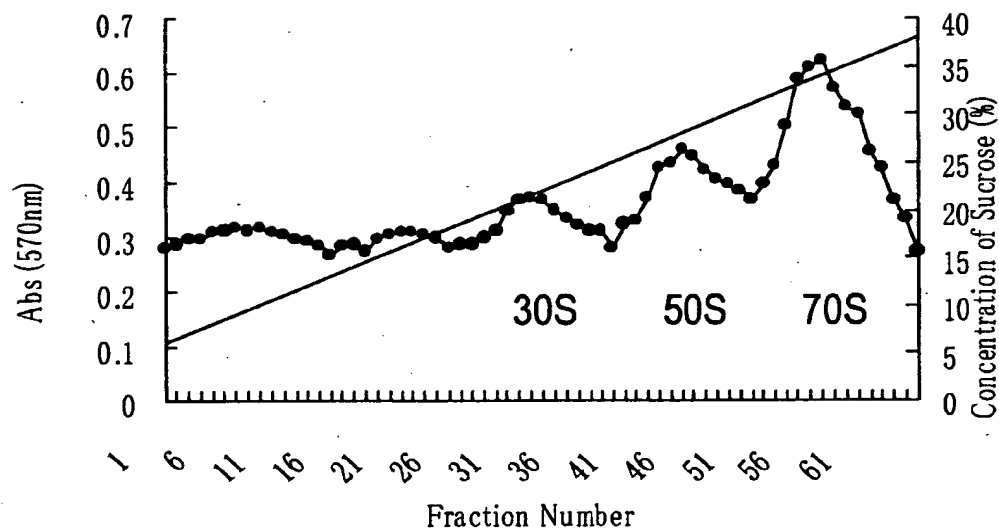
【図11】 本発明のin vitro合成系における非天然型アミノ酸導入のモデルとして、37番目にバリン残基が導入されたDHFRの生成を示す。

【図12】 His tagが付されたT7RNAポリメラーゼ のクロマトグラムを示す。

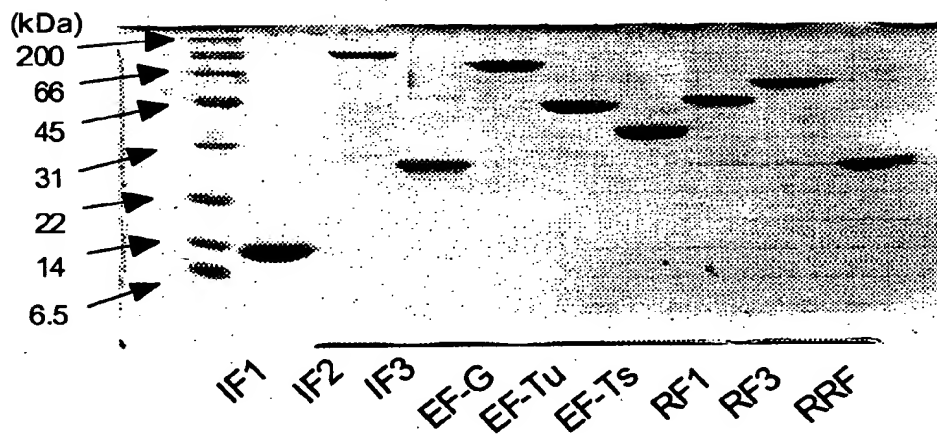
【書類名】 図面

【図 1】

# 糖密度勾配のクロマトグラム

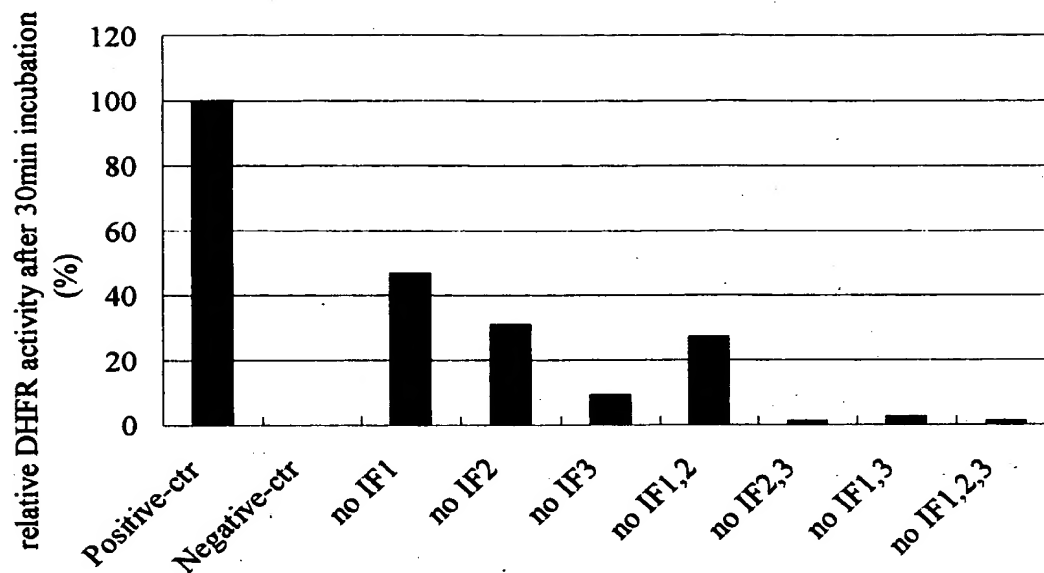


【図 2】

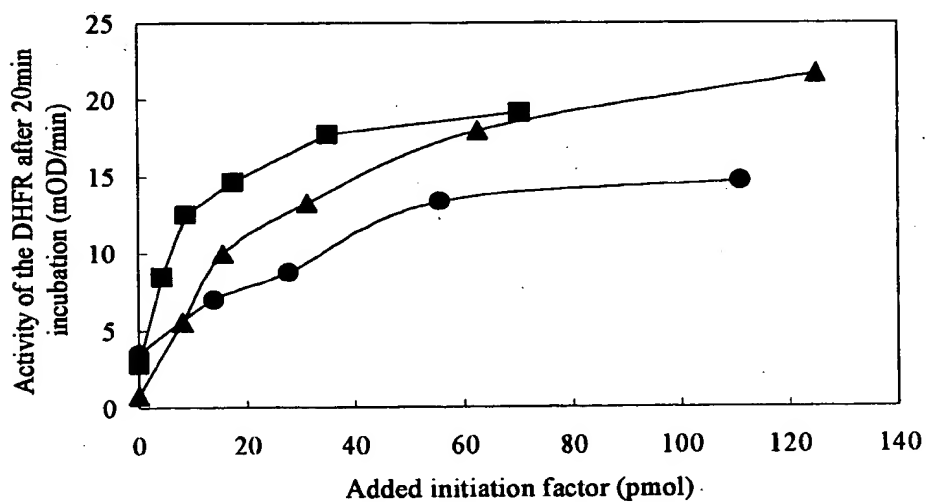


【図 3】

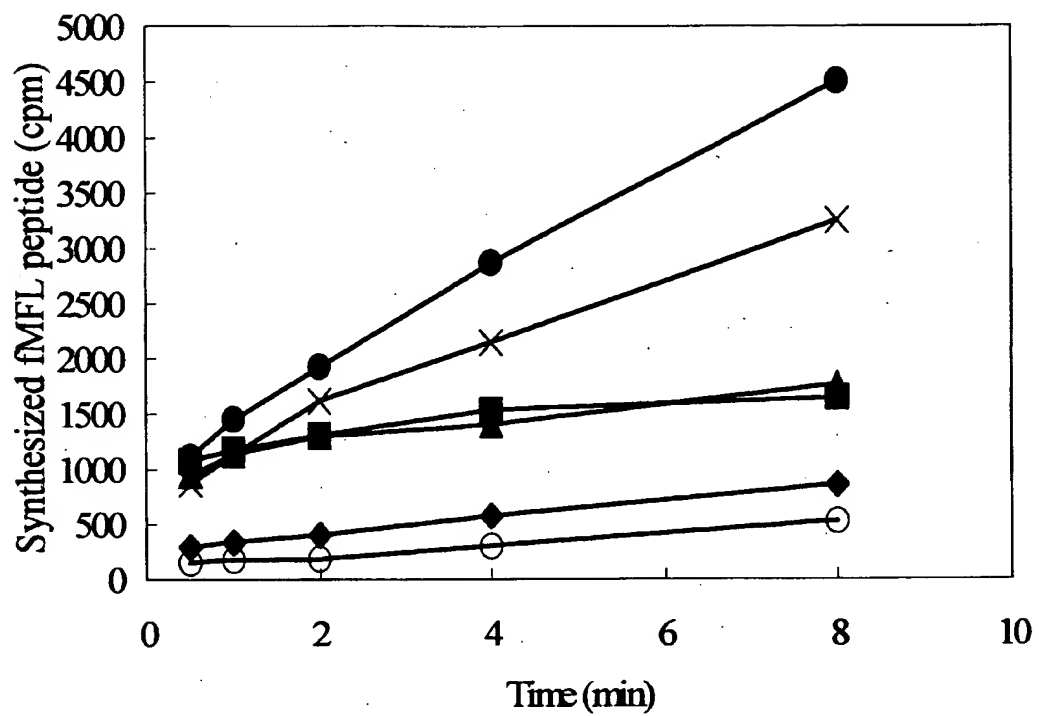
A



B

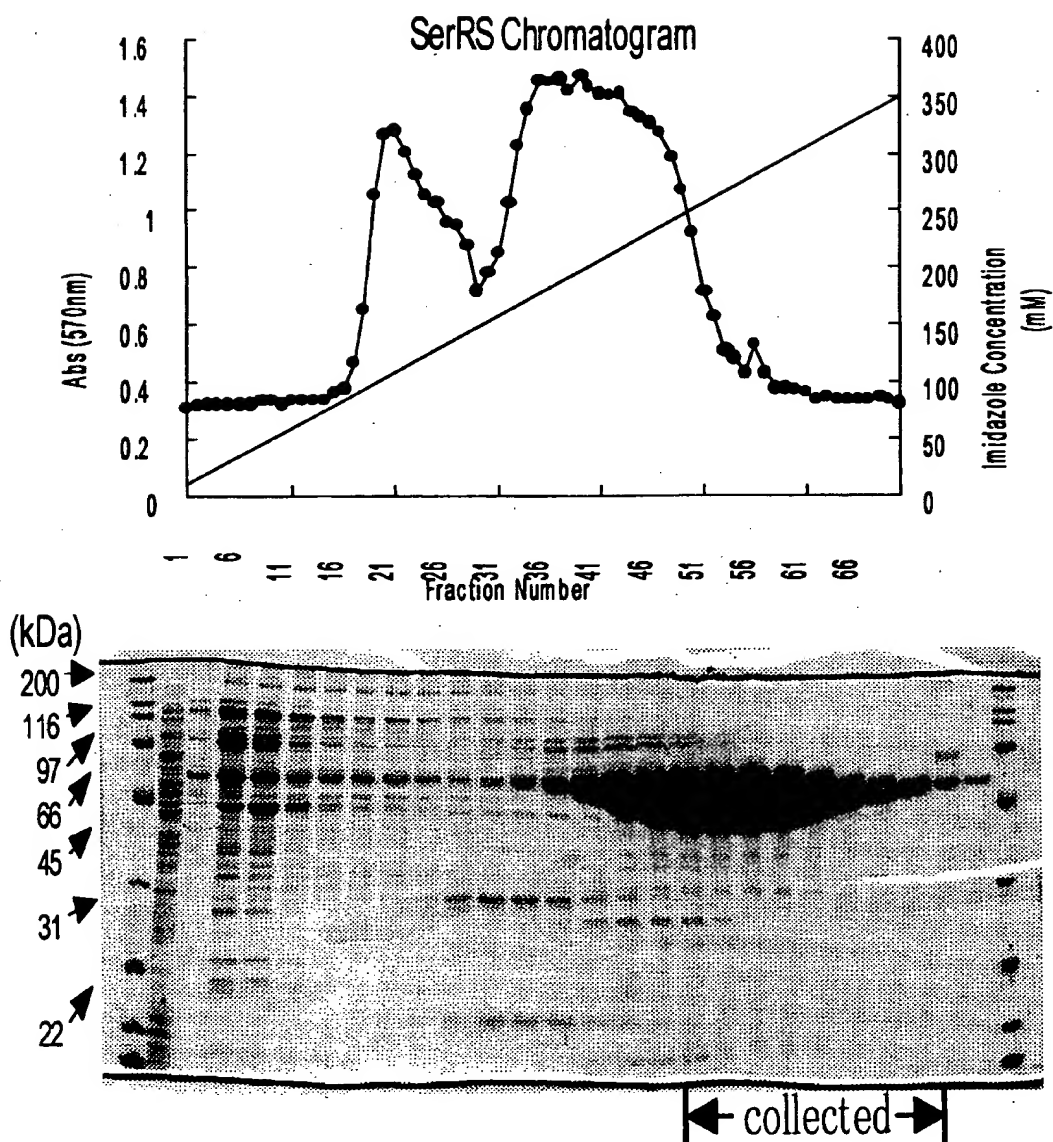


【図 4】





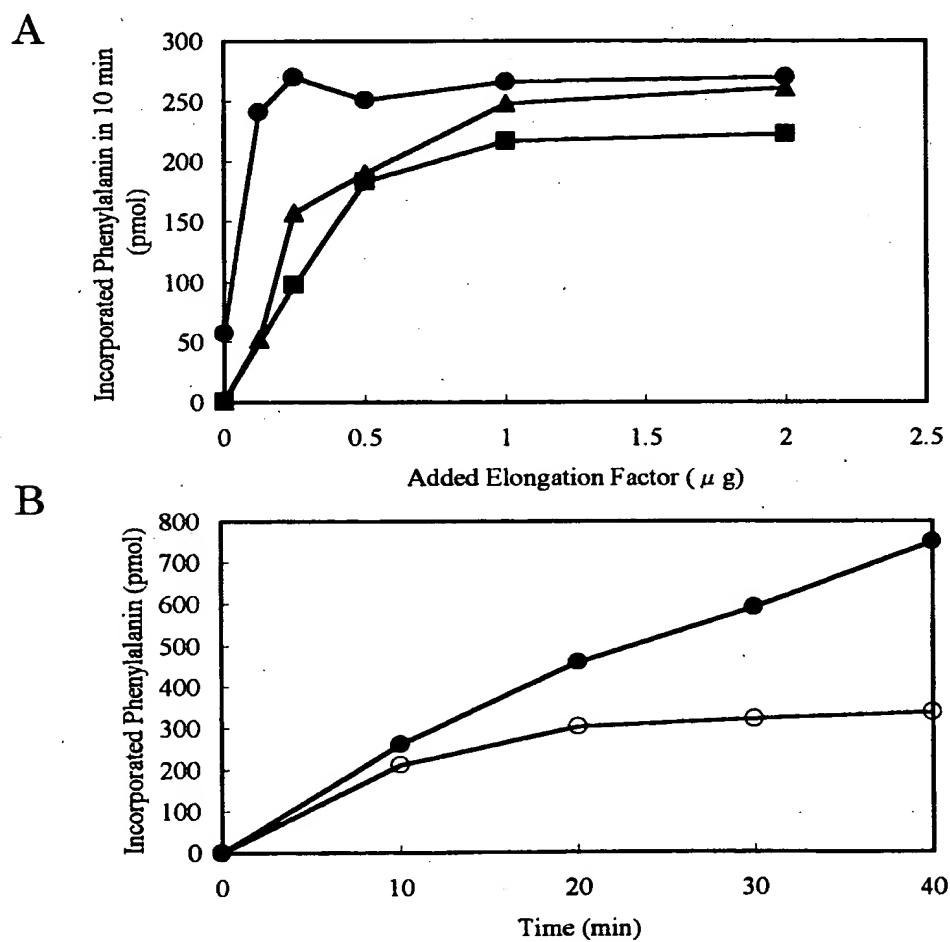
【図 5】



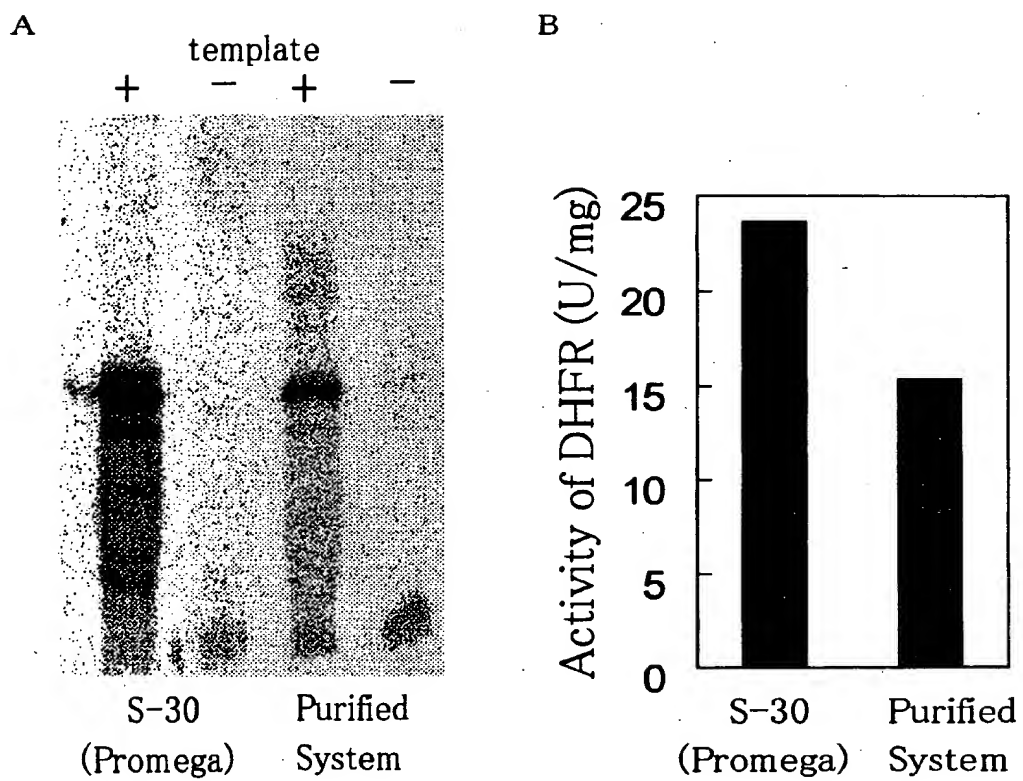
【図 6】



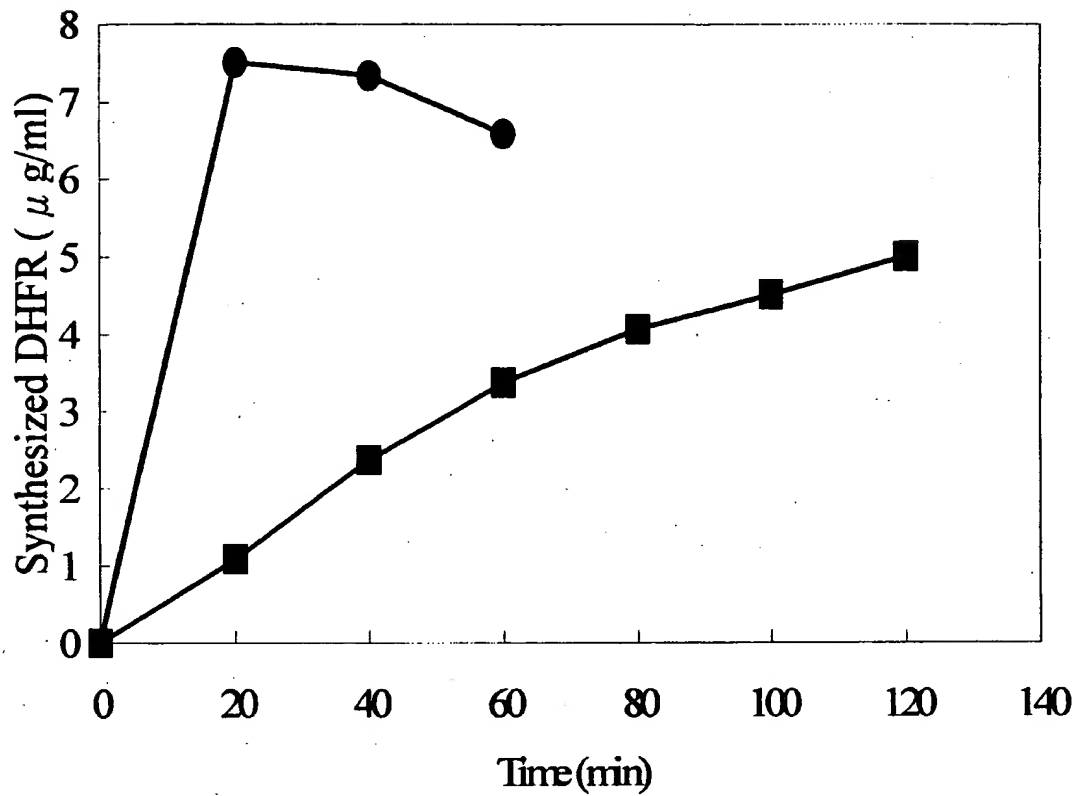
【図 7】



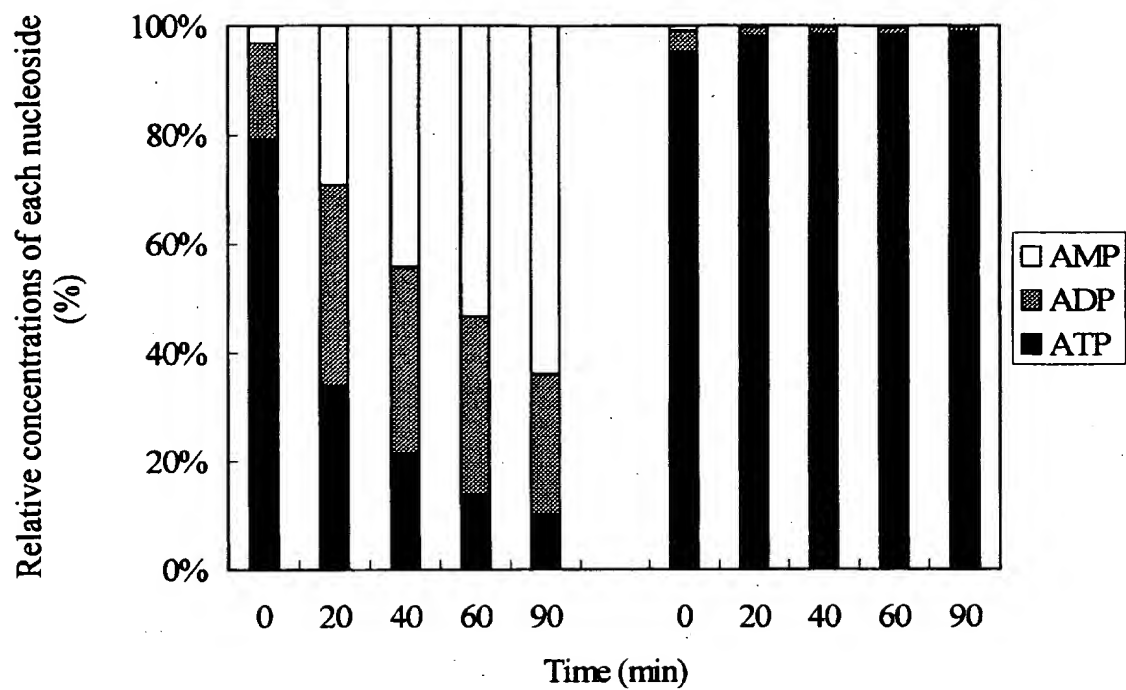
【図 8】



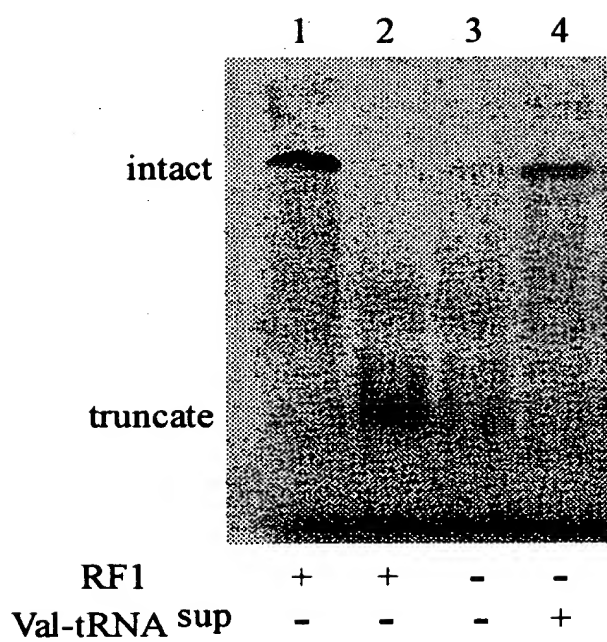
【図 9】



【図 10】

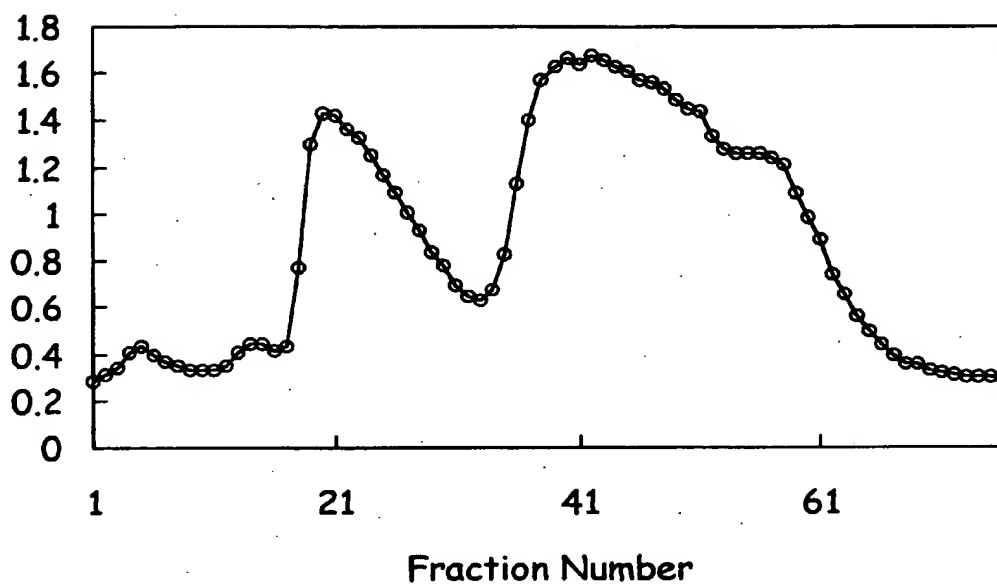


【図 11】

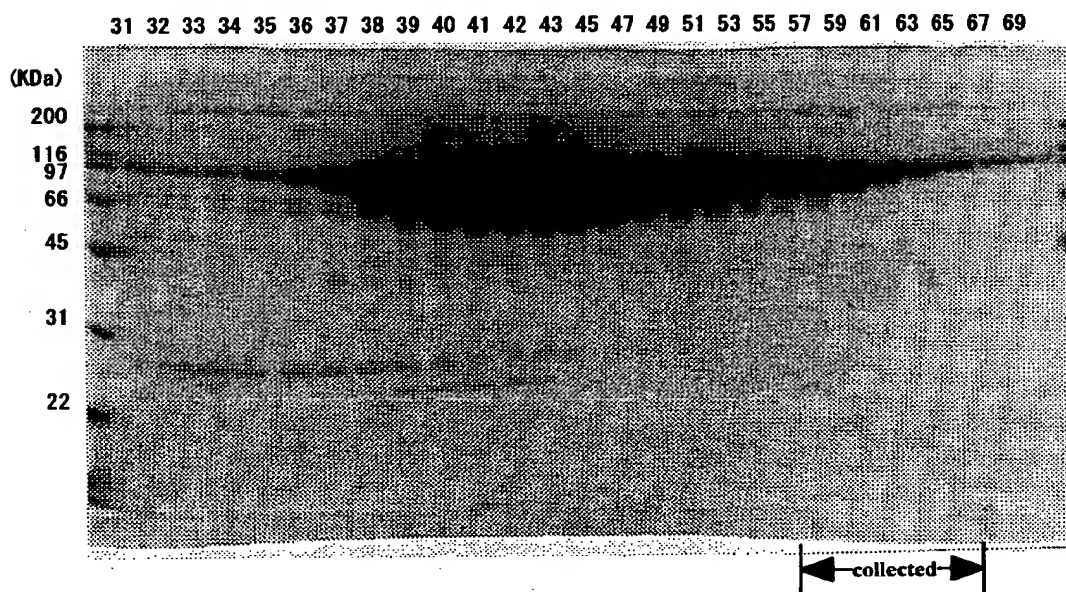


【図12】

A



B



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 in vitroのペプチド合成系において生成したペプチドを反応系から効率よく、しかも高純度で単離することができるin vitroペプチド合成系の構築を目指すと共に、反応系におけるエネルギー枯渇の問題を改善し、効率的な無細胞蛋白合成系の構築を目指した。

【解決手段】 in vitroでのDNA転写・翻訳系又はRNA翻訳系において、反応系を構成する蛋白質成分の一部又は全部が相互に付着し合う関係にある物質の一方でラベルされており、他方の物質が吸着体として合成反応終了後に該ラベルされた蛋白質成分を捕捉するために使用されることを特徴とするin vitro転写／翻訳系によるペプチド又はペプチド誘導体の製造方法。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成13年 1月12日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2000-401417

【補正をする者】

【住所又は居所】 東京都文京区西片 2 - 2 5 - 8、モンテベルデ本郷西片  
2 0 6 号

【氏名又は名称】 ベンチャーモール株式会社

【代理人】

【識別番号】 100082739

【弁理士】

【氏名又は名称】 成瀬 勝夫

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 委任状

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 委任状 1



(A)10100070020



委任状

平成12年12月21日

私（私ども）は、

識別番号100082739（弁理士）成瀬 勝夫氏

識別番号100083080（弁理士）平田 克文氏

を以って代理人として下記事項を委任します。

1. 「in vitro 転写／翻訳系によるペプチド等の製造方法」の特許出願に関する手続
1. 上記出願に基づく特許法第41条第1項又は実用新案法第8条第1項の規定による優先権の主張及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関する手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住所又は居所： 〒113-0024 東京都文京区西片2-28-8  
モンテベルデ本郷西片206号

氏名又は名称： ベンチャーモール株式会社

代表者： 代表取締役 村井 深



認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-401417
受付番号	10100070020
書類名	手続補正書
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成13年 2月21日

<認定情報・付加情報>

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501005184]

1. 変更年月日 2000年12月28日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都文京区西片2-25-8、モンテベルデ本郷西片206号  
氏 名 ベンチャーモール株式会社
2. 変更年月日 2001年 6月26日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都文京区西片2-25-8、モンテベルデ本郷西片206号  
氏 名 株式会社ポストゲノム研究所